

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

VICTOR HUGO PESSENTE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Streptomyces* sp. PARA
BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE ESPÉCIES AGRÍCOLAS DE
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

São Carlos - SP

2024

VICTOR HUGO PESSENTE DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Streptomyces* sp. PARA
BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE ESPÉCIES AGRÍCOLAS DE
IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia pela
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

São Carlos - SP
2024

*Dedico este trabalho a cada pequena
gentileza e boa ação fornecida a mim pelas
pessoas que me cercam e que me permitiu estar
aqui hoje.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, Lucimara, Gustavo e Antônio, pelo apoio incondicional, pela presença em todos os momentos, pela compreensão e pelo carinho me dado. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela orientação, pelas grandes oportunidades proporcionadas, pelo profissionalismo, pelo apoio nos momentos necessários e pelas lições de vida aprendidas.

Ao Dr. Paulo Henrique Andrade, Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, por estar lá para tirar minhas dúvidas, calibrar as expectativas e me motivar a seguir em frente.

Ao meu parceiro de laboratório, Daniel Stevão, pelo apoio nos experimentos e pelas várias noites e vários finais de semana passados no laboratório.

Ao Ms. Iron Amoreli, pela incrível parceria proporcionada, pela instrução técnica e profissional, pela formação oferecida e pela experiência pessoal e experimental sempre de bom grado ofertada.

Aos meus amigos, João Vitor, Caroline Maria e Gabriel Nunes, por sempre acreditarem em mim, por me socorrerem nos piores dias e por me darem alguns dos melhores.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, Ana Carolina Vasconcelos, Laísa Garcia, Giovana Gulhote e Mateus Matos, pela amizade e pelo apoio tanto nos experimentos quanto na vida.

À Dra. Sonia Buck, Departamento de Ciências Ambientais, UFSCar, pelas lições de vida e por ter se importado quando eu mais precisava.

Aos demais colegas, técnicos, docentes, terceirizados e demais funcionários do Departamento de Patologia e Morfologia da UFSCar, sem a contribuição de cada um a convivência e funcionamento pleno do laboratório jamais seria possível.

A todos os meus professores do Bacharelado de Biotecnologia, UFSCar, São Carlos, SP, por me ajudarem a me tornar o profissional que hoje sou.

Ao Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, pelo fornecimento das condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Agrivalle Brasil Indústria e Comércio de Produtos Agrícolas Ltda. por ter cedido para os propósitos dessa pesquisa a cepa MG04 de *Streptomyces* sp., pela parceria, pela experiência profissional incrível e pelo fornecimento do material necessário para os experimentos.

A agência de inovação da UFSCar, pela disponibilidade e atenção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa 180963/2023-6 do edital MAI/DAI.

RESUMO

Fungos são os fitopatógenos que mais afetam a produtividade agrícola global de forma substancial. O desenvolvimento de estratégias e abordagens sustentáveis para o controle de fungos fitopatogênicos e suas respectivas doenças se torna um tópico cada vez mais relevante em vista da crescente conscientização do consumidor em relação a problemática dos agrotóxicos. Actinobactérias são organismos majoritariamente encontrados no solo, capazes de desenvolverem relações simbióticas com vegetais e promover diversas vantagens para seus hospedeiros, incluindo resistência a estresses bióticos. *Streptomyces* é um gênero de actinobactérias particularmente conhecido por seu robusto metabolismo secundário e alto potencial biotecnológico na produção de compostos antimicrobianos, mas estudos apontam também o potencial de tais bactérias no controle biológico de doenças de plantas. O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico da cepa MG04 de *Streptomyces* sp., isolado do sedimento do mangue, contra fungos fitopatogênicos de interesse comercial no intuito de obter um panorama geral das propriedades antagonísticas da cepa orientar potenciais aplicações no biocontrole e manejo de doenças em plantas. Para tanto, foram realizados ensaios de antagonismo *in-vitro* com cultura dupla, ensaios com filtrado do cultivo celular e ensaios de antagonismo de compostos orgânicos voláteis, além da investigação do impacto das condições de cultivos no potencial antifúngico. O potencial antagonístico da cepa MG04 foi testada contra os seguintes gêneros de fitopatógenos: *Alternaria alternata*; *Bipolaris* sp.; *Ceratocystis paradoxa*; *Colletotrichum* sp.; *Lasiodiplodia ephorbicola*; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Rhizopus microsporus*; *Sphaceloma* sp. (CNPUV 102) e *Sclerotinia sclerotium*. Para tal, foi empregado o ensaio de cultura dupla em placa de Petri (32,20% à 79,67% de inibição), de difusão em ágar de filtrado do cultivo celular (10,54% à 53,57% de inibição), de produção de compostos orgânicos voláteis (19,70% à 86,68% de inibição) e foi aplicado metodologia OSMAC ajustada com design de Plackett-Burman para avaliação das variáveis de maior impacto na produtividade antimicrobiana. Entre os 9 fungos fitopatogênicos testados, 8 deles demonstraram inibição significativa do crescimento, das quais se destacam *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp. e *Sphaceloma* sp., agentes causadores da Mancha-de-*Bipolaris*, antracnose e do superenlongamento da mandioca, respectivamente.

Palavras-chave: Controle biológico; *Streptomyces* sp.; Fungos fitopatogênicos; Metabólitos antifúngicos; Compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

Fungi are the phytopathogens that most substantially affect global agricultural productivity. The development of sustainable strategies and approaches for the control of phytopathogenic fungi and their respective diseases has become an increasingly relevant topic because of growing consumer awareness regarding the issue of pesticides. Actinobacteria are organisms mostly found in soil, capable of developing symbiotic relationships with plants and promoting several advantages for their hosts, including resistance to biotic stresses. *Streptomyces* is a genus of actinobacteria particularly known for its robust secondary metabolism and high biotechnological potential in the production of antimicrobial compounds, but studies also point to the potential of such bacteria in the biological control of plant diseases. The present study aims to evaluate the antifungal potential of the MG04 strain of *Streptomyces* sp., isolated from mangrove sediment, against phytopathogenic fungi of commercial interest in order to obtain a general overview of the strain's antagonistic properties and guide potential applications in biocontrol and management of diseases in plants. To this end, *in-vitro* double-culture antagonism tests, cell culture filtrate antagonism and volatile organic compounds antagonism essays were carried in addition to investigation of the impact of cultivation conditions on the antifungal potential. The antifungal potential against phytopathogens was measured against *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp., *Ceratocystis paradoxa*, *Colletotrichum* sp.; *Lasiodiplodia euphorbicola*; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Rhizopus microsporus*; *Sphaceloma* sp. (CNPUV 102) and *Sclerotinia sclerotium*. To this end, the double plate culture assay (32.20% to 79.67% inhibition), diffusion test in cell culture filtrate agar (10.54% to 53.57% inhibition), of production of volatile organic compounds (19,70% to 86,68% inhibition) and OSMAC methodology adjusted with Plackett-Burman design was applied to evaluate the variables with the most significant impact on antimicrobial productivity. Of the nine fungi tested, 8 showed considerable growth inhibition, particularly *Bipolaris* sp., *Colletotrichum* sp. and *Sphaceloma* sp., causative agents of Bipolaris Spot, anthracnose and cassava superelongation, respectively.

Keywords: Biological control; *Streptomyces* sp.; Phytopathogenic fungi; Antifungal metabolites; Volatile organic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos actinomicetos esporulantes.	16
Figura 2: Representação das placas de Petri e das medidas no teste de antagonismo por cultura dupla.....	24
Figura 3: Fórmula adaptada para mensuração da porcentagem de inibição. Sendo tanto o crescimento micelial do controle quanto o do tratamento mensurados a partir da borda do disco do fungo.	24
Figura 4: Fórmula da % de inibição no teste de antagonismo de compostos orgânicos voláteis (VOCs).....	25
Figura 5: Representação das placas de Petri divididas no teste de antagonismo por compostos orgânicos voláteis (VOCs).....	25
Figura 6: Representação das placas de Petri no teste de antagonismo por difusão em poço de ágar do filtrado de cultivo.....	27
Figura 7: Viabilidade de células do banco criopreservado para as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} da suspensão de esporos.	31
Figura 8: Testes de antagonismo de cultura dupla contra os fungos <i>Alternaria alternata</i> , <i>Bipolaris</i> sp. e <i>Ceratocystis paradoxa</i>	32
Figura 9: Testes de antagonismo de cultura dupla contra os fungos <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Lasiodiplodia euphorbicola</i> e <i>L. pseudotheobromae</i>	33
Figura 10: Testes de antagonismo de cultura dupla contra os fungos <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Sclerotinia sclerotium</i> e <i>Sphaceloma</i> sp.	33
Figura 11: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida para os testes de antagonismo por cultura dupla contra fitopatógenos.	34
Figura 12: Repetições do ensaio de cultura dupla em <i>Sphaceloma</i> sp. com três suspensões de esporos distintas e três discos de fungo proveniente de diferentes placas, demonstrando a germinação de colônias avulsas.	35
Figura 13: Testes de difusão do filtrado em poço de ágar contra os fungos <i>Alternaria alternata</i> , <i>Bipolaris</i> sp. e <i>Ceratocystis paradoxa</i>	36
Figura 14: Testes de difusão do filtrado em poço de ágar contra os fungos <i>Colletotrichum</i> sp, <i>Lasiodiplodia euphorbicola</i> e <i>L. pseudotheobromae</i>	36
Figura 15: Testes de difusão do filtrado em poço de ágar contra os fungos <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Sclerotinia sclerotium</i> e <i>Sphaceloma</i> sp.	37
Figura 16: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida para os testes de antagonismo por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra os fitopatógenos.	38
Figura 17: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida para os testes de presença e potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis produzidos por <i>Streptomyces</i> sp contra fitopatógenos.....	40
Figura 18: Testes do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis contra os fungos <i>Alternaria alternata</i> , <i>Bipolaris</i> sp. e <i>Ceratocystis paradoxa</i>	40
Figura 19: Testes do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis contra os fungos <i>Colletotrichum</i> sp, <i>Lasiodiplodia euphorbicola</i> e <i>L. pseudotheobromae</i>	41
Figura 20: Testes do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis contra os fungos <i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Sclerotinia sclerotium</i> e <i>Sphaceloma</i> sp.....	41

Figura 21: Placas de Petri dos ensaios de antagonismo assistido por OSMAC, alterando a fonte de carbono e nitrogênio e observando o impacto no potencial antagônico por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra o fungo <i>Alternaria alternata</i>	42
Figura 22: Placas de Petri dos ensaios de antagonismo assistido por OSMAC, alterando a fonte de carbono e nitrogênio e observando o impacto no potencial antagônico por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra o fungo <i>Colletotrichum sp.</i>	43
Figura 23: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida nos testes de antagonismo por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra <i>Alternaria alternata</i> para cada fonte de carbono e nitrogênio testado.	44
Figura 24: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida nos testes de antagonismo por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra <i>Colletotrichum sp.</i> para cada fonte de carbono e nitrogênio testado.	44
Figura 25: Placas de Petri do antagonismo por difusão do filtrado celular em poço de ágar contra <i>Colletotrichum sp.</i> e <i>Alternaria alternata</i> do Ensaio 0, contendo a fonte de carbono (trealose) e de nitrogênio (extrato de levedura) selecionados.	46
Figura 26: Gráfico de Pareto e nível de significância do Plackett-Burman para a variável resposta "potencial antifúngico contra <i>Colletotrichum</i> ".	47
Figura 27: Representação em colunas da porcentagem de inibição por antagonismo de difusão do filtrado celular em poço de ágar contra <i>Colletotrichum sp.</i> , obtida nos ensaios OSMAC assistido por Plackett-Burmann.	49
Figura 28: Placas de Petri dos 15 ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann para antagonismo por difusão em poço de ágar contra o fungo <i>Colletotrichum sp.</i>	50
Figura 29: Meios de cultivo dos Ensaios 11, 12 e 13 do Plackett-Burmann antes da inoculação com esporos.	51
Figura 30: Colônias espessas que se formam na superfície do cultivo de <i>Streptomyces sp.</i> em um meio contendo Trealose após 7 dias.	51
Figura 31: Placas de Petri dos 15 ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann para antagonismo por difusão em poço de ágar contra o fungo <i>Alternaria alternata</i>	53
Figura 32: Representação em colunas a porcentagem de inibição por antagonismo de difusão do filtrado celular em poço de ágar contra <i>Alternaria alternata</i> , obtida nos ensaios OSMAC assistido por Plackett-Burmann.	53
Figura 33: Gráfico de Pareto e nível de significância do Plackett-Burman para a variável resposta "potencial antibacteriano".	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fungos fitopatogênicos usados neste trabalho, bem como suas doenças associadas, seus hospedeiros e suas respectivas referências.....	13
Tabela 2: Lista de antibióticos comercialmente disponíveis produzidos por <i>Streptomyces</i> sp.	16
Tabela 3: Biofertilizantes e produtos para biocontrole que constam espécies de <i>Streptomyces</i> como seu produto ativo.....	18
Tabela 4: Meios de cultura para escolha da fonte de carbono e Nitrogênio	28
Tabela 5: Valores utilizados no planejamento fatorial com para cada parâmetro aferido nos dois níveis empregados e nos pontos centrais.	29
Tabela 6: Matriz Plackett-Burmann dos componentes e das condições de cultivo variados para os ensaios de antagonismo assistido por metodologia OSMAC.	30
Tabela 7: Efeitos estimados, Erro padrão, t calculado e p-value de cada variável dos ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann no potencial antifúngico contra <i>Colletotrichum</i> sp.....	48
Tabela 8: Efeitos estimados, Erro padrão, t calculado e p-value de cada variável dos ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann no potencial antifúngico contra <i>A. alternata</i>	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Fungos fitopatogênicos e doenças de plantas	12
2.2 Potencial biotecnológico de bactérias do mangue.....	13
2.2 Actinobactérias	14
2.3 Gênero <i>Streptomyces</i>	15
2.4 <i>Streptomyces</i> no controle biológico	17
2.5 <i>Streptomyces</i> na produção de compostos metabólitos	18
2.6 Compostos orgânicos voláteis (VOCs)	19
2.7 Estratégia OSMAC (<i>One Strain Many Compounds</i>).....	20
2.8 Plackett-Burman Design (PBD)	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivo Específico	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Obtenção dos organismos.....	22
4.2 Reativação e avaliação da viabilidade da cepa <i>Streptomyces</i> MG04.....	23
4.3 Manutenção do banco de trabalho	23
4.3 Atividade antagonista da cepa em cultivo duplo inoculado com esporos.....	23
4.4 Atividade antagonista de compostos orgânicos voláteis (VOCs).....	24
4.5 Atividade antagonista do filtrado de cultivo por difusão em poço de ágar	26
4.5.1 Cultivo em meio líquido ISP-2 para produção de compostos antifúngicos	26
4.5.2 Filtração do caldo de cultivo bruto	26
4.5.3 Ensaio de antagonismo por difusão de filtrado em poço.....	26
4.6 Variações da atividade antagonista de filtrado de cultivo assistido por OSMAC.....	27
4.6.1 Escolha da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio	27
4.7.2 Modelagem estatística dos componentes do cultivo em metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Viabilidade do banco criopreservado	31

5.2 Potencial antagônico em cultura dupla.....	31
5.3 Potencial antagônico do filtrado por difusão em ágar	35
5.4 Presença e potencial antagônico de Compostos Orgânicos Voláteis	38
5.5 Escolha da Fonte de Carbono e Nitrogênio por meio do potencial antifúngico	39
5.6 Monitoramento das variações no potencial antagônico por metodologia OSMAC assistida.....	46
5.6.1 Análise estatística dos ensaios contra <i>Colletotrichum</i> sp.	47
5.6.2 Análise estatística dos ensaios contra uma bactéria.	52
6. CONCLUSÃO.....	56
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento tecnológico na agricultura é marcado por diversos problemas e desafios, dos quais os principais estão relacionados à demanda de elevados índices de produção num cenário global com a crescente escassez de recursos e degradação ambiental (Shivlata & Satyanarayana, 2017; Srivastav, 2020), com algumas estimativas sugerindo que a necessidade de produção agrícola crescerá em 70% até 2050 devido ao aumento da população mundial em até 9,7 bilhões (Molotoks, 2021; Bindraban et al., 2018). Neste sentido, o aumento da demanda alimentícia resulta em uma maior pressão no mercado agrícola na busca de estratégias e abordagens que resultem no aumento da produtividade e desempenho dos cultivares e ajudem no desenvolvimento ideal de culturas economicamente importantes (Zhang et al., 2018).

A estratégia comumente empregada na produção agrícola é a aplicação de fertilizantes químicos e pesticidas que podem aumentar a quantidade das colheitas, a segurança alimentar e o aumento da vida útil dos produtos (Kawasaki & Lichtenberg, 2015). Entretanto, apesar de sua considerável contribuição positiva no controle eficiente de doenças de plantas e pragas, nas últimas décadas é possível notar uma mudança significativa da percepção geral do público em preocupações sobre os efeitos negativos dos pesticidas químicos na saúde humana, bem como sobre seus impactos negativos no meio ambiente extensamente documentados (Kim et al. 2017), como a contaminação do solo, da água, lixiviação, eutrofização (Khan et al., 2014) e toxicidade para a fauna, flora e organismos benéficos no geral (Tudi et al. 2021).

Nesse contexto, o desenvolvimento de produtos e técnicas mais sustentáveis, seguras e eficazes para o manejo agrícola vem se tornando cada vez mais interessante para o mercado e consumidores (Silva et al., 2020; Melović et al., 2020). Para tanto, o uso de organismos no controle de doenças de plantas vem se tornando uma alternativa verde cada vez mais atraente, tanto pré como pós-colheita, especialmente em situações onde a resistência a doenças ou o controle químico não são alternativas viáveis (Dow et al, 2023). O uso de um microrganismo para o biocontrole pode trazer diversas vantagens, como uma maior especificidade ao organismo alvo, menor quantidade de resíduos potencialmente nocivos ao ambiente e menor indução da resistência nos patógenos (Collinge et al, 2022). Tais organismos são capazes de atuar no biocontrole por vários mecanismos distintos, mas muitas vezes interativos, como a competição por nutrientes, por espaço, pelo parasitismo, pela indução dos mecanismos de resistência, pela ação de metabólitos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas ou fitotoxinas (Silva et al., 2022; Collinge et al., 2022).

Entre as várias espécies de organismos aplicados no biocontrole, destacam-se os actinomicetos, bactérias do solo capazes de promover os mais diversos efeitos positivos para vegetais (Strobel, 2003). Essas bactérias são capazes de produzir uma gama de compostos de interesse capazes de acarretar efeitos negativos contra pestes típicas da agricultura, como

nematódeos (Yi et al., 2022), fungos, bactérias e até mesmo insetos (Liu et al., 2008). Além disso, actinobactérias atuam como possíveis simbiossiontes de plantas, colonizando o tecido vegetal sem causar atividade patogênica (Joo et al., 2021) e promovendo a saúde e crescimento da planta pelo aumento da biodisponibilidade de nutrientes como o fosfato e o nitrogênio (Silva et al., 2022), além de produzir uma gama de hormônios e enzimas promotores do crescimento vegetal, como o ácido indolacético (AIA) (Hsu, 2010), giberilinas e citoquininas (Rashad et al., 2015; Verma et al., 2019). Entre as diversas espécies de vegetais que os actinomicetos são capazes desenvolver relações simbióticas, muitas são relativas a culturas comercialmente relevantes, como a soja, o tomate, o trigo e o grão de bico (White et al., 2019).

O gênero *Streptomyces* sp. em específico se destaca por ser um dos maiores produtores de metabólitos bioativos do mundo, com aplicações na medicina e na indústria (Inbar et al., 2005) produzindo mais de 80% dos antibióticos conhecidos (Challis & Hopwood, 2003). Entretanto, apesar de seu elevado potencial para a produção de compostos de interesse antimicrobiano e de seu observado comportamento como possível organismo endofítico, o gênero *Streptomyces* ainda é relativamente pouco explorado na aplicação como agente de biocontrole quando comparado com actinobactérias típicas do biocontrole (Silva et al., 2022).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos fitopatogênicos e doenças de plantas

Apesar de representarem apenas uma pequena parcela da população total de fungos, os fungos fitopatogênicos são os principais agentes causais da maior parte das doenças típicas em plantios ao redor do mundo, sendo responsáveis por cerca de 80% de doenças vegetais de importância agrícola e econômica (Shuping & Eloff, 2017; El Hussein et al., 2014). A especificidade de alvo varia de fitopatógeno, alguns possuem hospedeiros específicos, enquanto outros têm uma ampla gama de hospedeiros, com certas espécies de plantas podendo ser hospedeiras de múltiplos patógenos fúngicos vegetais (González-Fernández et al., 2010; Agrios, 2005). Estima-se que na agricultura as perdas anuais nas colheitas devido a doenças fúngicas excedem os 200 mil milhões de euros, sendo gastos anualmente mais de 600 milhões de dólares em produtos fungicidas apenas nos Estados Unidos (Arora et al., 2006).

Além de acarretar em severos prejuízos para o plantio, fungos fitopatogênicos podem também causar perdas significativas nos processos pós-colheita, no manuseio, no armazenamento, na embalagem, transporte e até mesmo nas mãos do consumidor, sendo o principal agente biológico responsável pelo apodrecimento acelerado de frutas e vegetais frescos em processos pós-colheita, podendo destruir de 10 a 30% do rendimento nas etapas seguintes à colheita (Agrios, 2005). Mais de 100 espécies de fungos são responsáveis pela maioria das doenças pós-colheita (Tripathi &

Dubey, 2004).

Neste trabalho foram utilizadas 9 espécies de fungos fitopatogênicos, sendo elas: *Alternaria alternata*; *Bipolaris* sp.; *Ceratocystis paradoxa*; *Colletotrichum* sp.; *Lasiodiplodia euphorbicola*; *L. pseudotheobromae*; *Rhizopus microsporus*; *Sphaceloma* sp. (CNPUV 102) e *Sclerotinia sclerotium*. Os fitopatógenos e as doenças tipicamente associadas aos mesmos e as principais plantas hospedeiras estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Fungos fitopatogênicos usados neste trabalho, bem como suas doenças associadas, seus hospedeiros e suas respectivas referências.

Fungo Fitopatogênico	Doença(s) associada(s)	Alvos	Referência
<i>Alternaria alternata</i>	Mancha de alternaria; Míldio da batateira	Milho, Arroz, Algodão, Batata, Cevada, outros	Singh et al., (2015); Marin-Felix et al., 2019.
<i>Bipolaris</i> sp.	Podridão radicular de <i>Bipolaris</i> ; mancha foliar de <i>Bipolaris</i> .	Arroz, trigo, milho, sorgo, e várias espécies de gramíneas.	Manamgoda et al., 2014.
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	Podridão negra; Podridão mole	Abacaxi, seringueira, eucalipto, coco e outras.	Magalhães et al., 2015; Mbenoun et al., 2013.
<i>Colletotrichum</i> sp.	Antracnose de <i>Colletotrichum</i> .	Laranja, limão, café, cacau, manga, mandioca, e outros.	Marin-Felix et al., 2017; Barbieri et al., 2017
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	Podridão negra radicular de mandioca.	Mandioca, graviola, uva, cajazeira, manga, acerola.	Machado et al., 2014; Cimmino et al., 2017; Coutinho et al., 2017.
<i>L. pseudotheobromae</i>	Podridão seca de maniva	Mandioca, uva, manga, cajazeira, graviola, caju, acerola.	Cimmino et al., 2017; Coutinho et al., 2017.
<i>Rhizopus microsporus</i>	Podridão de rhizopus	Milho, girassol e arroz. Principalmente pós- colheita.	Williams et al., 1983; Partida-Martinez e Hertweck, 2005.
<i>Sphaceloma</i> sp.	Verrugose; Superalongamento de mandioca; Antracnose de <i>Sphaceloma</i> .	Feijão-frade, mandioca, acerola, uva e outros.	Alvarez et al., 2003; Kurata et al., 1954; Felber et al., 2016.
<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Podridão-de-esclerotinia	Soja, feijão, algodão, batata, tomate e outros.	Boland e Hall, 1994.

Fonte: Tabela elaborada pelo autor, respectivas referências na tabela.

2.2 Potencial biotecnológico de bactérias do mangue

O manguezal é um ecossistema costeiro, de transição entre o bioma marítimo e terrestre, característico pelo encontro de águas de rios com a do mar, ou diretamente expostos à linha da costa, conhecida também como região entre-marés. A vegetação do mangue é predominantemente

halófila por conta do fluxo constante entre água doce e salgada, com longas raízes para permitir sustentação no solo lodoso do mague e adaptada para a alta quantidade de matéria orgânica acumulada no ambiente (Cuzzuol & Campos, 2001; Dos Santos & De Lima, 2021). Por se tratar de um bioma de transição, onde vários ecossistemas distintos se encontram, o manguezal se torna um espaço onde ocorrem interações complexas entre vegetais, animais e microrganismos que ocupam a região do manguezal e são influenciados pelos fatores abióticos presentes em seu ambiente (Santos, 2017).

Os microrganismos do mague são conhecidos por seu considerável potencial como fonte de produtos biotecnológicos de alto interesse econômico em setores agrícolas, na promoção do crescimento vegetal e na substituição de pesticidas químicos, devido a muitas de suas características (Thatoi et al, 2013). Por conta da variação constante das condições ambientais, bem como a presença de diversos estressores biológicos naturais do bioma, muitos dos microrganismos do mague são dotados de mecanismos de resistência a ambientes extremos, os tornando naturalmente mais resistentes à condições bióticas e abióticas encontradas em ambientes, marcando-os como potenciais organismos de interesse para aplicação no cultivo e pode torná-los aptos para produzir novas substâncias com potencial biogênico (Sadeer et al, 2023; Thatoi *et al*, 2013). Por fim, muitos dos microrganismos isolados do mague são conhecidos por seu potencial na promoção do crescimento vegetal, seja pela produção de hormônios de crescimento, solubilização do fosfato, fixação do nitrogênio ou pela ação direta e indireta contra fitopatógenos (Thatoi *et al*, 2013; Bibi et al., 2018).

2.2 Actinobactérias

Dentre os diversos grupos de microrganismos que são conhecidos por atuarem no controle biológico, o filo das actinobactérias apresenta um potencial particular e bem estudado. Actinobactérias, também conhecidas como Actinomicetos, são um filo de bactérias filamentosas Gram-positivas quimiorganotróficas que crescem tipicamente em pH neutro, mas podem também se proliferar em condições alcalófilas ou acidófilas. Alguns dos membros específicos do filo podem desenvolver capacidades autotróficas, mas a grande maioria são heterotróficas, sendo extensamente estudadas devido à sua capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, incluindo antibióticos, enzimas e pigmentos de interesse biotecnológico. São encontradas nos mais diversos habitats, podendo ser isoladas tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos (Segaran et al., 2017).

. Comumente são capazes de exercer atividade endofítica e rizosférica, promovendo o crescimento dos vegetais (Hazarika et al., 2020), a fixação de nitrogênio (Gadkari et al., 1992), a produção de enzimas de interesse como as quitinases, glucanases, amilases, celulases, lipases e

proteases (Jog et al., 2016) e também aumentando a resistência a doenças e estresses abióticos, como seca e salinidade (Hazarika et al., 2020; Segaran et al., 2017). Além disso, elas também podem decompor a matéria orgânica no solo, liberando nutrientes importantes para as plantas e melhorando a estrutura e a fertilidade do solo (Bhatti et al., 2017).

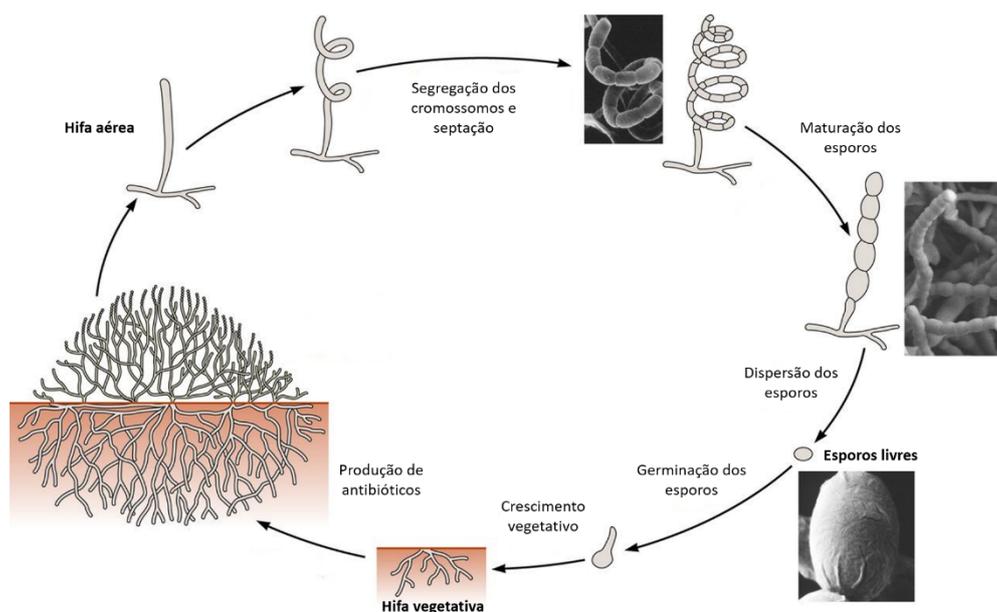
Por tais motivos, as actinobactérias, seus metabólitos e suas propriedades antimicrobianas são extensamente estudadas desde a década de 1920, com uma grande variedade de compostos bioativos sendo isolados das mesmas, começando com a streptomina na década de 1940 (Silva et al., 2022; Waksman et al., 2010). Apesar do extenso respaldo bibliográfico existente para as actinobactérias, é importante ressaltar que a tendência é um aumento ainda maior relativo a demanda global por produtos biotecnológicos e do aumento da exploração da biodiversidade microbiana (Silva et al., 2022).

2.3 Gênero *Streptomyces*

Dentre os muitos gêneros de Actinomicetos conhecidos, um dos que mais se destaca é o gênero *Streptomyces*. Representando a grande maioria dos actinomicetos encontrados em amostras de solo (Basilo et al., 2003) e sendo o mais amplamente estudado na literatura geral, bem como o mais testado no contexto de biocontrole de doenças de plantas e produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico (Inbar et al., 2005; Ebrahimi-Zarandi et al., 2022).

No que tange à morfologia, o gênero *Streptomyces* é conhecido por sua similaridade superficial à fungos, por conta da similaridade de seu micélio e de sua capacidade de formação de esporos aéreos, conídios, dispostos em cadeia ou em esporângio (Strobel, 2003). Esses esporos são capazes de germinar em micélios formadores de hifas vegetativas que penetram no meio de forma radicular para acessar os nutrientes nele disponíveis. Posteriormente, quando a colônia envelhece e os nutrientes começam a se esgotar, a bactéria começa a desenvolver ramos especializados que evoluem da superfície da colônia, resultando na hifa aérea produtora de esporos que cresce verticalmente e eventualmente irá continuar o ciclo reprodutivo por esporulação (Hu, Chen & Urban, 2012). A Figura 1 representa o ciclo reprodutivo do gênero *Streptomyces*.

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos actinomicetos esporulantes.



Fonte: Adaptado de Barka et al., 2016.

O gênero é conhecido por apresentar potencial particular na produção de metabólitos secundários de interesse com aplicações na indústria cosmética, farmacêutica, medicinal, pecuária e agropecuária (Inbar et al. 2005; Jog et al. 2016; de Sousa, Gonzaga, Lacava; 2017). Existe respaldo científico extenso e robusto das exímias propriedades antimicrobianas e antifúngicas do gênero *Streptomyces* que tornam o gênero como um alvo de interesse para aplicações no controle de patógenos (Matsumoto et al., 2017; Van der Meij et al.; Sánchez-Suárez et al., 2020; Quinn et al., 2020). É estimado que pelo menos três quartos de todas as espécies de *Streptomyces* sejam produtoras de antibióticos (Passari et al., 2017) e que dos 13.700 metabólitos bioativos provenientes de actinobacterias catalogados (Bérdy et al., 2012), mais de 75% deles são provenientes do gênero *Streptomyces* (Challis & Hopwood, 2003; Kharat et al., 2009). Alguns dos exemplos de compostos ativos provenientes de *Streptomyces* estão representados na Tabela 2.

Tabela 2: Lista de antibióticos comercialmente disponíveis produzidos por *Streptomyces* spp..

Espécie	Antibiótico	Espécie	Antibiótico
<i>S. orchidaccus</i>	Cicloserina	<i>S. erythraeus</i>	Eritromicina
<i>S. orientalis</i>	Vancomicina	<i>S. vensuella</i>	Cloranfenicol
<i>S. fradiae</i>	Neomicina, Actinomicina, Fosfomicina, Decamicina	<i>S. aureofaciens</i>	Clortetraciclina, Dimetilcloro, tetraciclina
<i>S. nodosus</i>	Anfotricina	<i>S. ambofaciens</i>	Espiramicina

<i>S. noursei</i>	Nistatina	<i>S. avermitilis</i>	Avermicina
<i>S. mediterranei</i>	Rifampicina	<i>S. alboniger</i>	Puromicina
<i>S. griseus</i>	Estreptomicina	<i>S. niveus</i>	Novobicina
<i>S. knanamyceticus</i>	Canamicina	<i>S. platensis</i>	Platenmicina
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramicina	<i>S. roseosporus</i>	Daptomicina
<i>S. spectabilis</i>	Espectinomicina	<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamicina
<i>S. viridifaciens</i>	Tetraciclina	<i>S. garyphalus</i>	Cicloserina
<i>S. lincolensis</i>	Lincomicina, Clindamicina	<i>S. vinaceus</i>	Viomicina
<i>S. rimosus</i>	Oxitetraciclina	<i>S. clavuligerus</i>	Cefalosporina

Fonte: modificado de Hasani et al., 2014.

2.4 *Streptomyces* no controle biológico

Agente de biocontrole é um termo que se refere a ferramentas microbiológicas empregadas para melhorar o rendimento das colheitas e gerar resultados benéficos no crescimento e na saúde das plantas por vários métodos como o hiperparasitismo, a predação, a antibiose e a competição por nutrientes e espaço (Nega et al. 2014). Esses agentes oferecem várias vantagens em relação aos pesticidas químicos, sendo altamente específicos para seus alvos, minimizando os danos aos organismos benéficos e à fauna não-alvo e têm baixo potencial de toxicidade para seres humanos e animais, reduzindo os riscos à saúde e ao meio ambiente. Mas é importante ressaltar que o sucesso do biocontrole depende de fatores como a escolha correta do agente, a compreensão da biologia da praga, a identificação precisa do problema e a implementação adequada das estratégias de manejo, sendo fundamental contar com o conhecimento e o suporte técnico adequados ao adotar essas práticas (Nega et al. 2014; Mahanty et al. 2017).

Conforme relatado, *Streptomyces* são bactérias que frequentemente apresentam propriedades alelopáticas proeminentes, sendo assim, sua implantação em sistemas agrícolas como agente potencial de biocontrole tem sido cada vez mais investigada nas últimas décadas, apesar de ainda ser relativamente pouco explorada quando comparada com outras actinobactérias (Silva et al., 2022; Barka et al., 2016). A Tabela 3 representa alguns dos muitos produtos disponíveis no mercado que fazem uso de formulações contendo cepas de *Streptomyces*.

Tabela 3: Biofertilizantes e produtos para biocontrole que constam espécies de *Streptomyces* como seu produto ativo.

Produto Comercializado	Espécie de <i>Streptomyces</i>	Aplicação
Actinovate® AG/Actinovate® SP	<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	Promoção de crescimento de plantas e fungicida
Actino-Iron®	<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC108	Promoção de crescimento de plantas e fungicida
Thatch Control	<i>Streptomyces violaceusniger</i> cepa YCED 9	Fungicida e nematicida
Mycostop®	<i>Streptomyces griseoviridis</i> cepa K61	Fungicida
YAN TEN <i>Streptomyces saraceticus</i>	<i>Streptomyces saraceticus</i> KH400	Fungicida

Fonte: Adaptado de Ebrahimi-Zarandi et al., 2022.

Existe robusto respaldo da literatura no uso de *Streptomyces* para controle biológico. Por exemplo, *S. aureofaciens* melhorou a proteção contra a antracnose pós-colheita em manga causada por *Colletotrichum gloesporioides* (Haggad & Abdall, 2011). Formulações à base de talco de *S. griseus* foram usadas para controlar a murcha de *Fusarium* na cultura do tomate (Anitha & Rabeeth, 2009). *Streptomyces* sp. foi usado para o controle biológico da casca prateada de tubérculos de batata produzidos por *Helminthosporium solani* (Elson et al., 1997). *Streptomyces rochei* em combinação com *Trichoderma harzianum* foi usado para controlar a podridão radicular em pimenta causada por *Phytophthora capsici* (Ezziyany et al., 2007). A eficácia do biocontrole da cepa AOK-30 de *Streptomyces padanus* é observada contra *Pestalotiopsis sydowiana* em mudas de louro-da-montanha cultivadas usando a técnica de cultura de tecidos (Meguro et al., 2004). Em um estudo semelhante, *Streptomyces* sp. cepa MBCu-56 é relatada para efeitos de biocontrole semelhantes na antracnose do pepino causada por *Colletotrichum orbiculare* (Shimizu, 2011).

2.5 *Streptomyces* na produção de compostos metabólitos

Outra característica das actinobactérias muito estudada por conta de seu alto interesse biotecnológico é seu enorme potencial para produção de antibióticos e biostáticos e, portanto, fornecendo um vasto reservatório de metabólitos com alto aplicação biotecnológica para a indústria (Bérdy et al., 2012). Exemplos desse potencial biotecnológico são os antibióticos ciclohexamida e estreptomicina, que foram os primeiros usados para controlar doenças fúngicas e bacterianas em plantas, são produzidos por *Streptomyces griseus* (Leben & Keitt, 1954). A kasugamicina, um

metabólito antibacteriano e antifúngico que inibe a síntese de proteínas em microrganismos, é utilizada para o controle do brusone do arroz causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* e doenças bacterianas causadas por *Pseudomonas* em diversas culturas, sendo inicialmente obtida de *Streptomyces kasugaensis* (Umezawa et al., 1965).

Considerando o potencial antimicrobiano dos metabólitos e a relação natural encontrada em muitas espécies de actinobactérias, é esperado que endofíticas produtoras de substâncias antibióticas demonstrem a capacidade de proteger as plantas do ataque de patógenos, como é o caso da *Streptomyces galbus* R-5, produtora de actinomicina X2 e fungicromina, oferecendo proteção contra a mancha de *Pestalotiopsis longisetula* (Hasegawa et al., 2006). Alguns estudos também utilizaram actinobactérias produtoras de antibióticos para o controle de doenças foliares, como antracnose em inhame (Palaniyandi et al., 2011) e mancha foliar de alfafa (Samac et al., 2003). É importante ressaltar que, por conta da associação dessas bactérias com vegetais, muitos dos metabólitos antibióticos produzidos por actinobactérias têm um enorme potencial como bio-fumigantes na agricultura, podendo se tornar alternativas ecologicamente corretas para químicos, como o brometo de metila, o [1, 3-dicloropropano] e a cloropicrina (Shrivastava & Kumar, 2018).

2.6 Compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Compostos orgânicos voláteis produzidos por microrganismos (VOCs ou MVOCs) são caracterizadas por seu baixo peso molecular, baixo ponto de ebulição e alta pressão de vapor, conseqüentemente se evaporam facilmente e são responsáveis por parte do odor característico de cada microrganismo, sendo muito utilizados como sinalizadores de contaminação na indústria alimentícia (Carpenter et al., 2017; Morath et al., 2012). Diversas classes de compostos se enquadram na definição de VOCs, dentre elas podemos citar: álcoois, aldeídos, compostos aromáticos, sulfetos, terpenóides e ésteres. São uma classe de substâncias produzidas principalmente como subprodutos metabólicos tanto primários quanto secundários e que por tal motivo, a composição do perfil de compostos voláteis tende a ser altamente específicas para cada espécie de microrganismo (Korpi et al., 2019).

Os VOCs são produtos de alto interesse comercial principalmente na indústria alimentícia, pois sua aplicação não requer contato direto de microrganismos com os alimentos e se dispersam mais facilmente, não se acumulando no alimento em si, sendo assim considerados como potenciais bio-fumigantes para armazenamento de safras e aplicação no plantio e pós-colheita no controle de doenças vegetais. Os VOCs derivados de bactérias, especificamente, são geralmente polares e possuem baixo peso molecular, fazendo com que possam se difundir mais facilmente no solo e por maiores distâncias (Zhao et al., 2022).

Streptomyces foi reportado como produtor de compostos voláteis por diversas fontes, como

por exemplo Le et al. (2022), onde a cepa AN090126 de *Streptomyces* sp. apresentou propriedades alelopáticas ou antipatogênicas contra *Sclerotinia homoeocarpa*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas euvesicatoria*. É possível citar também o trabalho de Wang e colaboradores (2013), onde VOCs de *Streptomyces alboflavus* apresentaram potencial inibitório *in-vitro* contra *Fusarium moniliform*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, e *Penicillium citrinum*.

2.7 Estratégia OSMAC (*One Strain Many Compounds*)

Enquanto se encara um contexto de progressiva resistência microbiológica, poucos produtos antibióticos efetivos são desenvolvidos em plenitude e adentraram o mercado nas últimas décadas devido a desafios na triagem de candidatos adequados, no desenvolvimento de compostos antibióticos prospectivos e antibióticos e do fato que a grande maioria dos compostos antagônicos oriundos do metabolismo secundário padrão de organismos produtores de antibióticos já foi caracterizado nas últimas de 5 décadas (Hoskisson & Seipke, 2020.; Payne et al., 2007; Bailey et al., 2011).

Entretanto, estudos utilizando a técnica de sequenciamento do genoma completo (WGS) mostram que apenas uma pequena porção do potencial biossintético de certos microrganismos de interesse é expressa sob condições padrão de cultura *in vitro* (Khare et al., 2018). Hoje em dia, o arcabouço da descoberta de compostos com propriedades antibióticas está baseado no emprego de abordagens genômicas para identificação e prospecção de clusters de genes biossintéticos e de diversas técnicas para estimular o metabolismo secundário (Pan et al. 2019; Hoskisson & Seipke, 2020.).

A estratégia OSMAC (*One Strain Many Compounds*) é uma abordagem metodológica abrangente, simples e robusta empregada frequentemente para descobrir compostos crípticos e silenciosos em microrganismos, mas além de seu uso clássico ela também pode ser utilizada para a otimização da produção de compostos orgânicos naturais e para investigação das vias metabólicas secundárias de um organismo teste. A abordagem OSMAC é baseada na alteração dos parâmetros do meio de cultivo como: temperatura, salinidade, pH, nutrientes, agitação, adição de enzimas, de químicos, quelantes e co-cultivo com organismos com propriedades simbióticas ou antagonísticas, no intuito de acarretar em alterações que resultem na indução de vias de produção de metabólitos secundários (Romano et al., 2018; Pan et al. 2019). Um exemplo de actinomiceto otimizado pela metodologia OSMAC pode ser encontrado no trabalho de Liu e colaboradores (2017), onde *Streptomyces* sp. (isolado da formiga) cepa 1H-GS5 se mostrou capaz de produzir um novo derivado de espectinabilina quando cultivada em meio composto por amido de milho 10%, soja em pó 1%, farinha de algodão 1%, α -amilase 0,02%, NaCl 0,1%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄ · 7H₂O 0,1%, CaCO₃ 0,7%, ácido ciclohexanocarboxílico 0,1%, pH 7,0 otimizado por metodologia

OSMAC adaptada.

As fontes de carbono e nitrogênio são dois fatores de alto impacto na viabilidade e metabolismo celular, e por isso são duas das principais variáveis investigadas em estudos de variação de meios (Ruiz et al., 2010; Pan et al., 2019). A fonte de carbono impacta os mais diversos âmbitos do metabolismo celular, mas dentre suas principais funções pode-se citar o fornecimento da base para a expansão da biomassa, seu papel como o composto mais representativo da energia biológica heterótrofos e também pela mesma ser geralmente a fonte de moléculas de carbono para a composição de metabólitos secundários. A fonte de nitrogênio, por outro lado, é componente obrigatório para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, além de fornecer unidades de Nitrogênio para a composição de metabólitos secundários. Sabe-se que o tipo de fontes de carbono e nitrogênio utilizadas têm uma influência significativa no metabolismo secundário microbiano (Pan et al., 2019; Ruiz et al., 2009; Singh et al., 2017). Além disso, é importante ressaltar que a relação C/N é um dos fatores importantes que afetam os produtos de fermentação (Pan et al., 2019; Karakoç & Aksöz, 2004; Brzonkalik et al., 2012; Dinarvand et al., 2013).

2.8 Plackett-Burman Design (PBD)

Considerando que os bioprodutos derivados de microrganismos são tipicamente obtidos do cultivo destes em laboratório, há o interesse em entender e eventualmente otimizar esses processos biossintéticos, de modo a executar esse procedimento de forma mais eficiente. Tais condições ótimas de cultivo, tanto bióticas como abióticas, vão variar de acordo com a biologia do microrganismo e a química das moléculas de interesse, ressaltando a complexidade envolvida em processos desta natureza. Neste contexto, o planejamento estatístico de experimentos é um método essencial tanto para o desenvolvimento quanto aprimoramento de processos. Sua utilização permite o estudo de diferentes variáveis independentes, de modo a encontrar o ponto ótimo de cada componente, entendendo a influência de cada um no processo a ser otimizado. Além disso, a aplicação do planejamento fatorial visa a redução de variabilidade de resultados, redução de tempo de análise e também, a redução de custos (Button, 2012; Cunico et al., 2008).

O desenho experimental Plackett-Burman (PBD), desenvolvido pelos autores de mesmo nome (Plackett & Burman, 1946) é um método eficaz para investigar o efeito da composição e das condições do cultivo, sendo muito útil para rastrear as variáveis mais importantes no que diz respeito aos seus efeitos principais (Armin et al., 2021). O Plackett-Burman (PBD) é capaz de estimar o impacto de uma série de fatores independentes (variáveis), em uma dada quantidade de níveis (denominados como L), de modo a minimizar a variância das estimativas em um número reduzido de experimentos, evitando assim a necessidade de reproduzir o experimento em um fatorial completo e diminuindo o volume experimental final do teste. O número total de

experimentos realizados de acordo com o PBD é $n + 1$, onde n é o número de variáveis. É importante ressaltar, entretanto, que os resultados do PBD não descrevem a interação entre as variáveis, mas são usados para rastrear e avaliar as variáveis que têm um impacto significativo na resposta. Em outras palavras, é recomendado que o PBD seja utilizado em projetos de prospecção, onde o interesse está apenas na identificação dos principais efeitos, e onde as interações entre os fatores possam ser consideradas como insignificantes se comparadas com os mesmos (Silva et al, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a atividade antagonista de *Streptomyces* sp., cepa MG04, contra fitopatógenos de importância agrícola e econômica mediante aplicação de diferentes ensaios de antagonismo relativo contra os fungos fitopatogênicos e da modificação das condições de cultivo.

3.2 Objetivo Específico

- Avaliar e quantificar o potencial inibitório *in vitro* de células viáveis da cepa MG04 contra diferentes fungos fitopatogênicos;
- Avaliar, quantificar e comparar a atividade antagonista do filtrado do cultivo celular da cepa MG04 contra os fungos fitopatogênicos;
- Verificar a possível produção e respectivo potencial inibitório de compostos orgânicos voláteis produzidos pela cepa MG04;
- Investigar a viabilidade do design de Plackett-Burman assistido por OSMAC para identificação de fatores de cultivo de maior impacto no potencial antifúngico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos organismos

A cepa MG04 de *Streptomyces* sp., isolada de sedimento do mangue, com potencial endofítico foi providenciada pelo banco de culturas microbianas da Agrivalle Brasil Indústria e Comércio de Produtos Agrícolas Ltda. Horst Frederico João Heer, 1420 – Indaiatuba – SP CEP: 13348-758.

Linhagens dos fungos patogênicos: *Alternaria alternata*; *Bipolaris* sp.; *Ceratocystis paradoxa*; *Colletotrichum* sp.; *Lasioidiplodia euphorbicola*; *L. pseudotheobromae*; *Rhizopus microsporus*; *Sphaceloma* sp. (CNPUV 102) e *Sclerotinia sclerotium* fazem parte do banco de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Paulo.

4.2 Reativação e avaliação da viabilidade da cepa *Streptomyces* MG04

Cepa MG04 foi obtida de uma suspensão de esporos criopreservada em ultrafreezer à -80°C em glicerol 20%, de acordo com a metodologia adaptada de Shepherd et al. (2010).

Para reativação da cepa, foi plaqueado 100 uL da suspensão em placas de Petri descartáveis contendo meio ISP-4 e incubadas por 28°C por 14 dias. Para avaliação de possíveis contaminações, uma alíquota da suspensão foi estriada em placas contendo meio BDA e também incubada por 28°C por 14 dias.

Para avaliação da viabilidade dos conídios criopreservados, foi realizada diluição seriada em solução salina Tween 80 (0,05%) da suspensão de esporos, seguida da inoculação de 100 uL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em placas de Petri descartáveis contendo meio ISP-2 e espalhadas com uma alça de Drigalski descartável. As placas foram incubadas a 28°C por 14 dias. Após 14 dias, as colônias isoladas foram contadas e a média e desvio padrão foi obtida (Zin et al., 2010).

4.3 Manutenção do banco de trabalho

Seguindo a metodologia adaptada por Shepherd et al. (2010), suspensões de esporos utilizadas nos ensaios foram extraídas de placas ISP-4 incubadas por 14 a 21 dias. Para a coleta dos esporos, 15 mL de solução salina Tween 80 (0,05%) foi alíquotado diretamente na placa e com o auxílio de uma alça de inoculação, o micélio foi raspado e os esporos foram suspensos na solução. A suspensão foi transferida e armazenada em tubos Falcon 50 mL. As suspensões de esporos utilizadas foram, com auxílio de uma alça de inoculação, estriadas em placas contendo meio BDA para avaliação de possíveis contaminações. Além disso, a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada suspensão foi obtida pela contagem de colônias isoladas de placas de ISP2 incubadas 28°C por 14 dias após inoculação de 100 uL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} da suspensão em solução salina Tween 80 (0,05%).

O banco de trabalho dos fungos fitopatogênicos foi obtido pelo repique de discos de ágar armazenados em frascos de vidro contendo água destilada estéril pela técnica de Castellani (Araújo et al., 2014) em placas de Petri descartáveis contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubadas a 28°C por 14 dias.

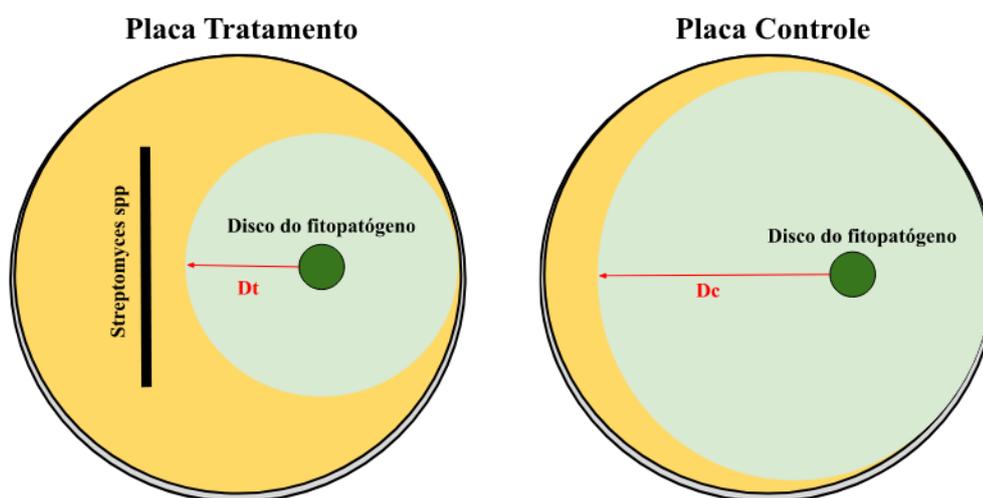
4.3 Atividade antagonista da cepa em cultivo duplo inoculado com esporos

O potencial antagônico da cepa MG04 em relação aos fungos fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp., *Ceratocystis paradoxa*, *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia eufhorbicola*,; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Rhizopus microsporus*, *Sphaceloma* sp. (CNPUV 102) e *Sclerotinia sclerotium* foi analisado por meio de testes de antagonismo por cultura dupla em um

protocolo adaptado de Khamna et al. (2009).

Para cada fitopatógeno, um disco de 0,5 cm de diâmetro foi retirado de uma placa de 14 dias e foi transferido aproximadamente 2 cm à direita do centro da de uma placa de Petri contendo meio BDA. Aproximadamente 4 cm à esquerda de onde o disco foi depositado, foi aliqotado 20 uL de uma suspensão de esporos da cepa MG04 (aproximadamente $1,09 \times 10^5$ UFC/ml⁻¹) e com o auxílio de uma alça de inoculação, a mesma foi estriada no formato de linha paralela ao disco de fitopatógeno, como mostra a Figura 2. Nas placas de controle, apenas o disco micelial foi adicionado à placa. Todos os fitopatógenos foram realizados em duplicata.

Figura 2: Representação das placas de Petri e das medidas no teste de antagonismo por cultura dupla.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As placas foram incubadas a 28°C por 14 dias e a taxa de inibição do crescimento do fitopatógeno foi calculada usando a fórmula adaptada de (Quiroga, Sampietro & Vattuone, 2001), representado na Figura 3, onde os valores de Dc e Dt são referentes às médias dos respectivos testes.

Figura 3: Fórmula adaptada para mensuração da porcentagem de inibição. Sendo tanto o crescimento micelial do controle quanto o do tratamento mensurados a partir da borda do disco do fungo.

$$\% \text{inibição} = \frac{\text{Crescimento micelial do controle (Dc)} - \text{Crescimento micelial do Tratamento (Dt)}}{\text{Crescimento micelial do controle (Dc)}} \times 100$$

Fonte: adaptada de Quiroga, Sampietro & Vattuone, 2001.

4.4 Atividade antagonista de compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Para a avaliação do impacto da presença de possíveis compostos orgânicos voláteis no crescimento e morfologia dos fungos fitopatogênicos, foi utilizado uma metodologia com placas

de Petri com divisória contendo meio BDA dos dois lados adaptada de Le et al. (2022). De um lado da placa, uma alíquota de 50 uL de suspensão de esporos de *Streptomyces* sp. cepa MG04 ($4,75 \times 10^4$ UFC/mL⁻¹) foi plaqueada 3 dias antes da inoculação com o fungo. Nas placas controle esse lado não foi plaqueado com a suspensão de esporos. Após 3 dias, um disco de 0,5 cm diâmetro de cada fitopatógeno foi retirado de uma placa de 14 dias de crescimento e transferido do outro lado à aproximadamente 2 cm do centro da placa. As placas foram seladas duas vezes com parafilme e incubadas a 28°C por 3 dias, onde foram abertas e a inibição calculada pela fórmula adaptada representada na Figura. Esta fórmula visa medir a inibição a partir da área quadrada total do micélio, enquanto exclui a área do disco do fungo transferido para a placa, para tanto, a área do disco é calculada e subtraída da área do controle e do tratamento. A Figura 5 representa as placas utilizadas nesse ensaio e as medidas nele empregadas.

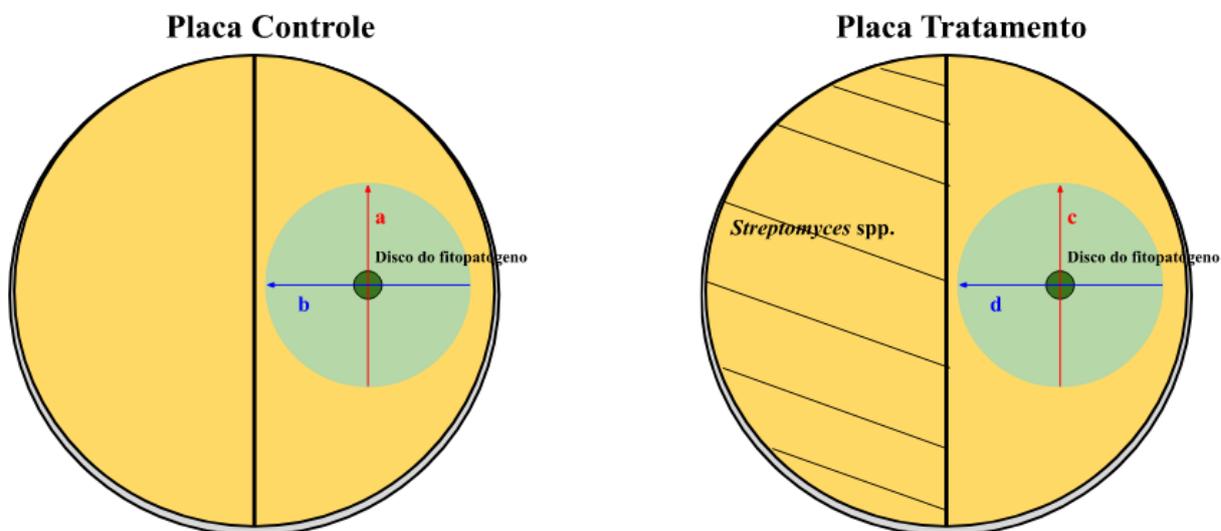
Figura 4: Fórmula da % de inibição no teste de antagonismo de compostos orgânicos voláteis (VOCs).

$$\text{inibição (\%)} = \frac{((a \times b) - (\pi \cdot r^2)) - ((c \times d) - (\pi \cdot r^2))}{((a \times b) - (\pi \cdot r^2))} \times 100$$

Sendo: a = comprimento da colônia fúngica no controle (cm); b = largura da colônia fúngica no controle (cm); c = comprimento da colônia fúngica no tratamento (cm); d = largura da colônia fúngica no tratamento (cm); r = raio do disco do fungo fitopatogênico.

Fonte: Adaptado de Le et al., 2022 e Quiroga; Sampietro; Vattuone, 2001.

Figura 5: Representação das placas de Petri divididas no teste de antagonismo por compostos orgânicos voláteis (VOCs)



Sendo: a = comprimento da colônia fúngica no controle (cm); b = largura da colônia fúngica no controle (cm); c = comprimento da colônia fúngica no tratamento (cm); d = largura da colônia fúngica no tratamento (cm).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Atividade antagonista do filtrado de cultivo por difusão em poço de ágar

4.5.1 Cultivo em meio líquido ISP-2 para produção de compostos antifúngicos

Para avaliação do potencial antagonístico do filtrado de cultivo livre de células foi inoculado 100 uL de suspensão de esporos ($2,45 \times 10^4$ UFC/ml⁻¹) em frascos de fundo arredondado de 250 mL contendo 100 mL de cultivo líquido ISP-2 (Kieser et al. 2000). Os cultivos foram transferidos para uma incubadora *shaker* e incubados a 28°C, 180 rpm, por 14 dias. O ensaio foi realizado em triplicata. 7 dias após inoculação, a presença de possíveis contaminações foi averiguada por estria em placa de BDA com o auxílio de alças de inoculação descartáveis em condições estéreis. O cultivo que não apresentou contaminação foi selecionado para a próxima etapa.

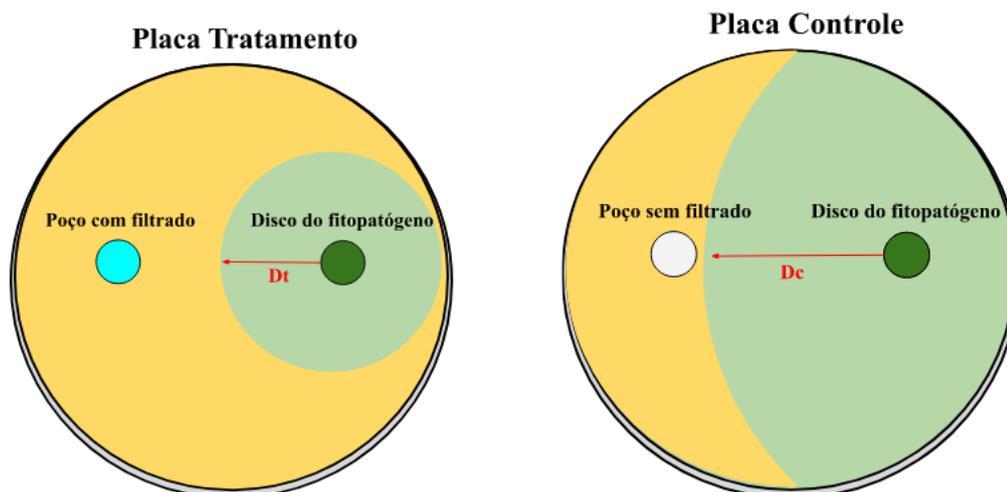
4.5.2 Filtração do caldo de cultivo bruto

Após o período de incubação, foi aliquoteado 1 mL do caldo de cultivo bruto em 12 microtubos de fundo cônico de 1,5 mL com o auxílio de uma pipeta de 1000 uL. Os tubos foram centrifugados sem refrigeração a 14000 rpm por 10 minutos para formação do *pellet* contendo as células. Imediatamente após os 10 minutos, os tubos foram levados para dentro de uma cabine de fluxo laminar e a fase aquosa da solução foi transferida para um tubo de 50 mL. O caldo de cultivo centrifugado foi então coletado com uma seringa de 10 mL e filtrado em um filtro estéril PES para seringa com membrana de 0,22- μ m em um protocolo adaptado de Krespach et al. (2023).

4.5.3 Ensaio de antagonismo por difusão de filtrado em poço

Utilizando-se de ponteiros de 1000 uL, foi feito um poço de 0,5 cm de diâmetro em placas contendo meio BDA aproximadamente 2 cm à esquerda do centro da placa. Em seguida, seguindo metodologia adaptada de Grammer et al. (1976) foi pipetado uma alíquota de 50 uL do filtrado dentro do poço e observado por 30 minutos para averiguar a possibilidade de o mesmo escorrer para debaixo da placa. Os tubos Falcon 50 mL contendo o filtrado livre de células e conídios foram vortexados por 10 segundos imediatamente antes de qualquer uso. Para cada fitopatógeno, foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro retirado de uma placa de 14 dias de crescimento equidistante do centro da placa no lado oposto do poço. Todos os testes foram realizados em triplicata. A Figura 6 representa as placas utilizadas nesse ensaio.

Figura 6: Representação das placas de Petri no teste de antagonismo por difusão em poço de ágar do filtrado de cultivo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias e a taxa de inibição do crescimento do fitopatógeno foi também calculada usando a fórmula adaptada de (Quiroga, Sampietro & Vattuone, 2001), representado na Figura 3, onde os valores de Dc e Dt são referentes às médias obtidas das triplicatas respectivos testes.

4.6 Variações da atividade antagonista de filtrado de cultivo assistido por OSMAC

4.6.1 Escolha da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio

Para as próximas etapas dos ensaios auxiliados pela metodologia OSMAC, onde a quantidade das fontes de carbono e a de nitrogênio seriam variadas, foi necessário primeiramente definir quais seriam as fontes utilizadas nas mesmas. Para tanto, foi escolhido como base um meio líquido otimizado para produção de metabólitos em *Streptomyces* adaptado de Chen et al. (2022), de composição K_2HPO_4 (0.27 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.50 g/L), $CaCO_3$ (1.00 g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.10 g/L) e NaCl (3.0 g/L), pH=7.2 (+/-0.1). As fontes de carbono analisadas foram: Dextrose, Trealose, Extrato de Malte, Glicerol e Amido. Da mesma forma, as fontes de nitrogênio analisadas foram: Nitrato de Potássio (KNO_3), Sulfato de Amônia ($(NH_4)_2SO_4$), Peptona Bacteriológica, Extrato de Levedura e Extrato de Soja. A quantidade das fontes de carbono foi padronizada em 10 g/L, enquanto as fontes de nitrogênio foram padronizadas em 1 g/L. Para analisar a significância das fontes de carbono, o Nitrato de Potássio (KNO_3) foi fixado como fonte de Nitrogênio. No mesmo sentido, a Dextrose foi fixada como fonte de carbono quando a fonte de Nitrogênio estava sendo variada. A Tabela 4 representa os 9 meios obtidos.

Tabela 4: Meios de cultura para escolha da fonte de carbono e Nitrogênio

	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio
Ensaio A	Dextrose	KNO ₃
Ensaio B	Trealose	KNO ₃
Ensaio C	Extrato de Malte	KNO ₃
Ensaio D	Glicerol	KNO ₃
Ensaio E	Amido	KNO ₃
Ensaio F	Dextrose	(NH ₄) ₂ SO ₄
Ensaio G	Dextrose	Extrato de Levedura
Ensaio H	Dextrose	Peptona
Ensaio I	Dextrose	Extrato de Soja

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi então preparado 100 mL de cada um dos meios em frascos de fundo arredondado de 250 mL, inoculados com 100 uL de suspensão de esporos ($1,09 \times 10^4$ UFC/mL⁻¹) e incubados por 7 dias a 28°C. Após o período de incubação, foi repetido o protocolo de avaliação de atividade antagonista do filtrado do cultivo por difusão em poço de ágar (descrito no item 4.5 deste documento) para cada ensaio.

Após a análise dos resultados, foi preparado, seguindo a mesma metodologia, um meio (intitulado de Ensaio 0) utilizando a fonte de carbono e Nitrogênio selecionadas a partir dos testes preliminares. Foram utilizadas as mesmas condições de cultivo e concentração dos componentes. Todos os protocolos de filtração do caldo bruto e antagonismo por difusão em poço de ágar descritos no parágrafo anterior foram repetidos para o Ensaio 0. Após 7 dias de incubação, a porcentagem de inibição foi aferida.

4.7.2 Modelagem estatística dos componentes do cultivo em metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann

Com o objetivo de identificar quais variáveis de cultivo e componentes do meio influenciam a produção de moléculas com potencial antifúngico e por consequência a porcentagem de inibição contra os mesmos, foi realizado variação dos parâmetros de cultivo da cepa (OSMAC) orientado pelo planejamento experimental desenvolvido pelo design de Plackett-Burman (PBD) utilizando o software Protimiza Experimental Design. O experimento foi montado com 8 variáveis diferentes e independentes em 2 níveis: aumentado (+1) e reduzido (-1) e 3 pontos centrais (0),

retornando para duas variáveis resposta, sendo essas a taxa de inibição fúngico (%) e a taxa de inibição bacteriano, como representado na Tabela 5. As variáveis analisadas foram: Trealose (g/L), Extrato de Levedura (g/L), K_2HPO_4 (g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L), NaCl (g/L), $CaCO_3$ (g/L), Tempo de incubação (dias) e Temperatura ($^{\circ}C$). A partir do preenchimento da matriz, o PBD designou as condições e parâmetros de 15 ensaios, sendo os 12 primeiros referentes as variações distintas das condições aumentada e reduzida enquanto os 3 últimos referentes às triplicatas dos pontos centrais. Uma representação da matriz com os parâmetros de cada um dos ensaios pode ser observada na Tabela 6.

Cada ensaio foi montado para 100 mL de meio em frascos de fundo arredondado de 250 mL, inoculado com 100 uL de suspensão de esporos ($1,14 \times 10^4$ UFC/mL⁻¹) e incubados pelo tempo de cultivo e temperatura indicados na Tabela 6. Após o período de incubação, foi repetido o protocolo de avaliação de atividade antagonista do filtrado do cultivo por difusão em poço de ágar (descrito no item 4.5) para cada ensaio.

Tabela 5: Valores utilizados no planejamento fatorial com para cada parâmetro aferido nos dois níveis empregados e nos pontos centrais.

Variável	Unidade	-1	0	+1
Trealose	g/L	10	15	20
Extrato de Levedura	g/L	1	3	5
K_2HPO_4	g/L	0,17	0,27	0,37
$MgSO_4$	g/L	0,3	0,5	0,7
Temperatura	$^{\circ}C$	28	30	32
Tempo de incubação	dias	7	10,5	14
NaCl	g/L	1	3	5
$CaCO_3$	g/L	0,7	1	1,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6: Matriz Plackett-Burmann dos componentes e das condições de cultivo variados para os ensaios de antagonismo assistido por metodologia OSMAC. As variáveis resposta “Potencial antifúngico” e “Potencial antibacteriano” discutidas posteriormente estão destacadas em cinza.

Ensaio	Trealose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	Temperatura (°C)	Tempo de incubação (dias)	NaCl (g/L)	CaCO ₃ (g/L)	Potencial Antifúngico (%)	Potencial Antibacteriano (%)
1	20	1	0,37	0,3	28	7	5	1,3	73,33	4
2	20	5	0,17	0,7	28	7	1	1,3	61,25	77
3	10	5	0,37	0,3	32	7	1	0,7	41,05	65
4	20	1	0,37	0,7	28	14	1	0,7	69,05	73
5	20	5	0,17	0,7	32	7	5	0,7	40	63
6	20	5	0,37	0,3	32	14	1	1,3	14,29	0
7	10	5	0,37	0,7	28	14	5	0,7	50,75	4
8	10	1	0,37	0,7	32	7	5	1,3	48,85	74
9	10	1	0,17	0,7	32	14	1	1,3	42,5	71,6
10	20	1	0,17	0,3	32	14	5	0,7	40,48	8
11	10	5	0,17	0,3	28	14	5	1,3	51,25	75,5
12	10	1	0,17	0,3	28	7	1	0,7	74,29	71
13	15	3	0,27	0,5	30	10,5	3	1	31,09	15
14	15	3	0,27	0,5	30	10,5	3	1	53,1	73
15	15	3	0,27	0,5	30	10,5	3	1	47,62	72

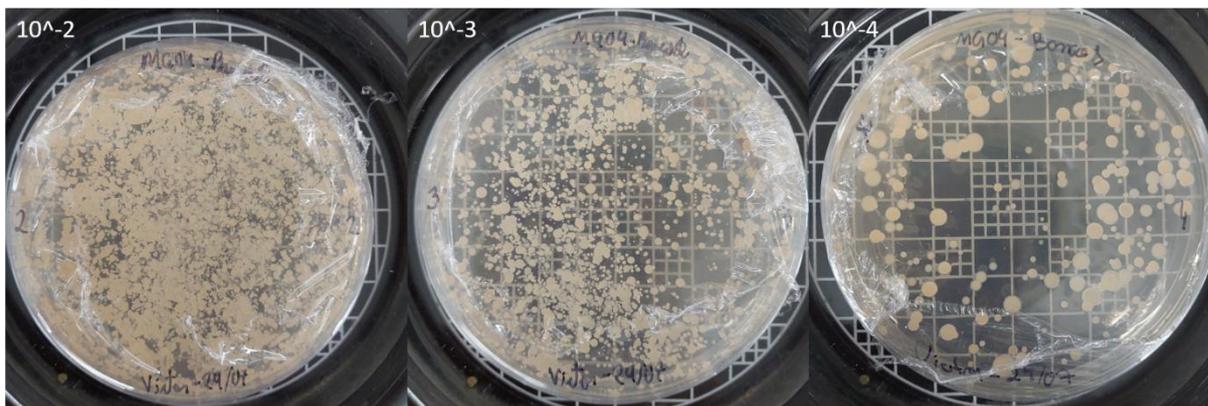
Fonte: Adaptado pelo autor da aba de Metodologia do Software Protimiza Experimental Design.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade do banco criopreservado

Por meio das análises em *spread-plate* das diluições seriadas, a viabilidade e integridade do banco criopreservado foi confirmada por contagem de células viáveis, expressas em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC.g-1). O banco apresentava aproximadamente $1,30E+04$ células viáveis e nenhuma contaminação aparente. Os resultados obtidos das três diluições do banco podem ser observados na figura 8.

Figura 7: Viabilidade de células do banco criopreservado para as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} da suspensão de esporos.



Fonte: Registrado pelo autor.

5.2 Potencial antagonístico em cultura dupla

O ensaio de antagonismo em placa de cultura dupla é o método mais comumente usado para triagem de isolados bacterianos quanto ao antagonismo fúngico, tendo sido muito utilizada no passar dos anos na identificação de muitos microrganismos com potencial antagonista (Nysanth et al., 2022). A técnica é baseada na comparação de efeitos de antagonismo que surgem da interação de dois componentes biológicos distintos em uma mesma placa. Por meio da avaliação da inibição do crescimento e da mudança da morfologia, é possível então observar os efeitos no metabolismo e morfologia dos agentes biológicos decorrentes do contexto específico de interação entre os agentes (Senthilkumar et al., 2021).

Por conta da simulação parcial da interação dos agentes na natureza, o ensaio de cultura dupla é um excelente teste de triagem para observar o potencial de biocontrole de uma bactéria contra fungos (Raaijmakers et al., 2010). Importante ressaltar que existem sim outros ensaios *in vitro* que podem ser empregados para os mesmos propósitos que podem melhor similar as condições do campo e a interação vegetal-fitopatógeno (Anith et al. 2002, 2003; Daayf et al. 2003; Dinu et al. 2007). No entanto, tais ensaios necessitam de uma maior preparação, são mais difíceis de serem realizados e o processo de obtenção de resultados são notavelmente mais demorado. Nesse

trabalho um protocolo adaptado do ensaio de cultura dupla por parede de esporos foi empregado para examinar o potencial antagonístico de *Streptomyces* sp. (MG04) contra os 9 fungos fitopatogênicos de interesse (Figuras 8, 9 e 10).

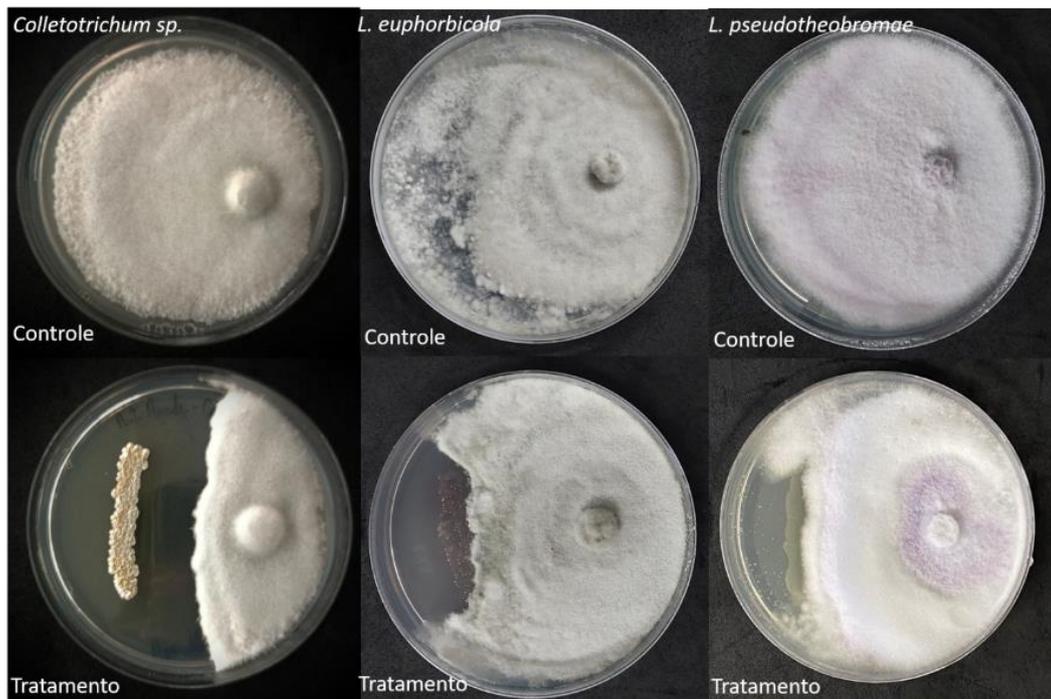
Foi observado que tanto *Ceratocystis paradoxa* (Figura 8) quanto *Sclerotinia sclerotium* (Figura 10) não apresentaram efeito inibitório padrão nos ensaios realizados, com a ausência de halo típico ou inibição padrão do crescimento. É importante ressaltar, entretanto, que ambos são fitopatogênicos de crescimento vigoroso (Mbenoun et al., 2013; Boland e Hall, 1994), colonizando a placa em menos de 4 dias no caso do *S. sclerotium* e em 7 no caso do *C. paradoxa*. Além disso, é possível notar uma mudança na morfologia local (destacado pelas setas azuis) de ambos os fungos, quando em proximidade à parede de células de *Streptomyces* sp.. Quando em proximidade à colônia de bactérias, é possível observar redução da formação de hifas aéreas e um afinamento do micélio do fungo, sugerindo que apesar do efeito alelopático da cepa não ser o suficiente para inibir efetivamente o crescimento dos fungos, a cepa ainda é capaz de exercer algum efeito antagonístico contra os fitopatogênicos.

Figura 8: Testes de antagonismo de cultura dupla contra os fungos *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp. e *Ceratocystis paradoxa*. As setas azuis representam a área onde foi possível observar afinamento do micélio.



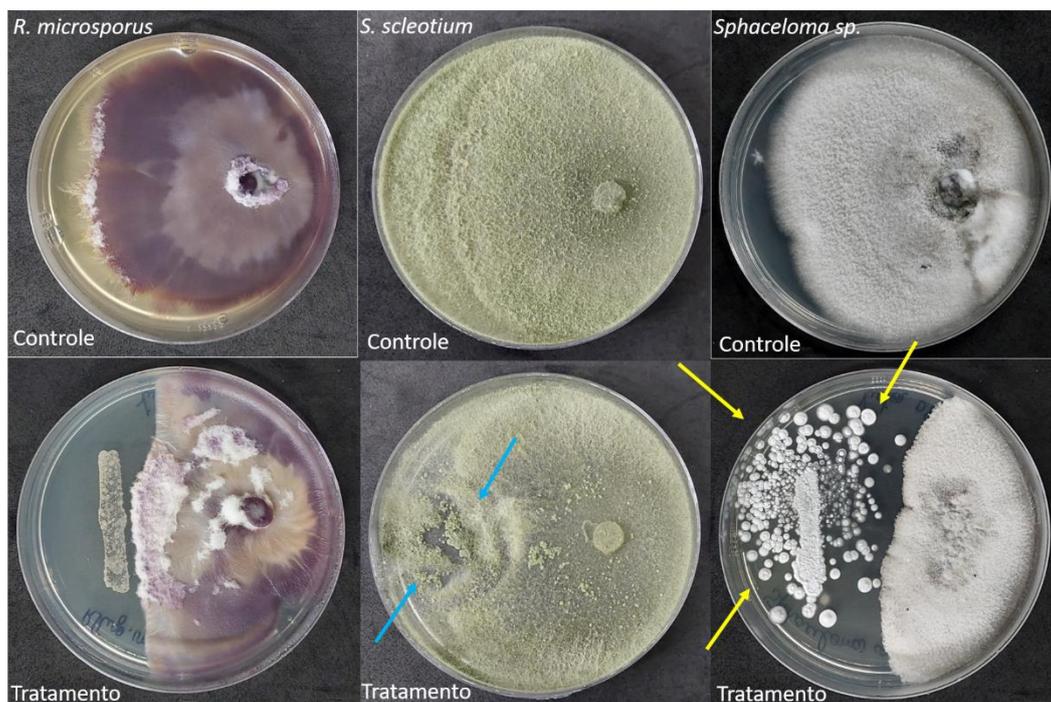
Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 9: Testes de antagonismo de cultura dupla contra os fungos *Colletotrichum* sp., *Lasiodiplodia euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*.



Fonte: Registrado pelo autor.

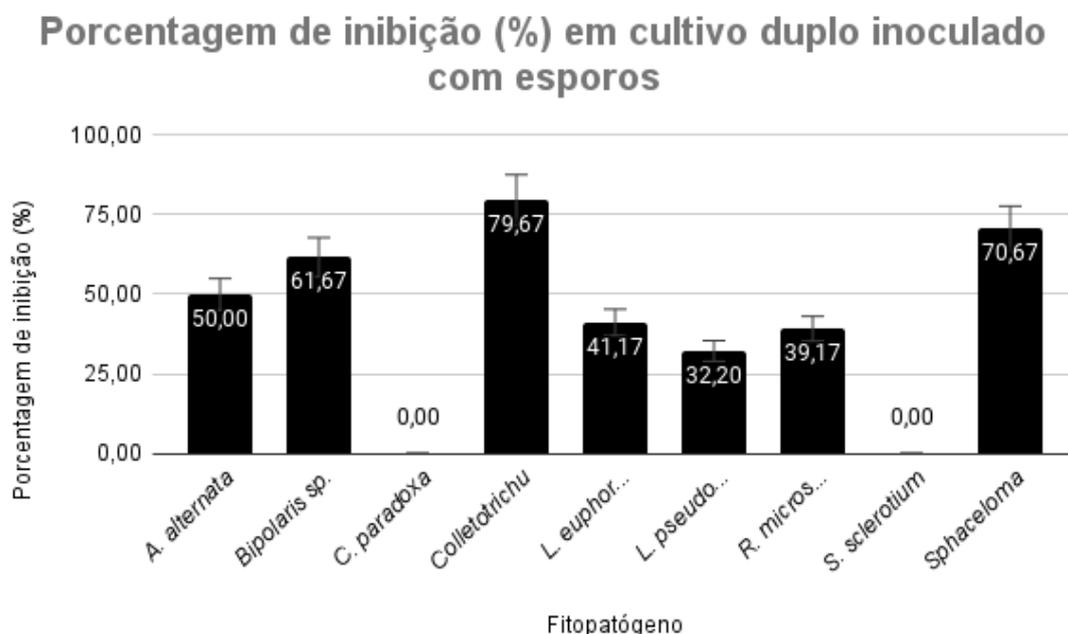
Figura 10: Testes de antagonismo de cultura dupla contra os fungos *Rhizopus microsporus*, *Sclerotinia sclerotium* e *Sphaceloma* sp.. Setas azuis representam a área onde foi possível observar afinamento do micélio. Setas amarelas representam a interação entre o *Sphaceloma* sp. e o *Streptomyces* sp., dando origem à colônias satélites que se espalham pela placa.



Fonte: Registrado pelo autor.

Com exceção do *C. paradoxa* e *S. sclerotium*, a cepa MG04 apresentou potencial antagonístico *in vitro* contra todos os outros fitopatógenos testados, como apresentado na Figura 11, variando entre uma porcentagem de inibição de 32,20% (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*) até 79,67% (*Colletotrichum* sp.). Em especial se destacam o *Colletotrichum* sp (Figura 9), um dos fungos fitopatogênicos de maior impacto econômico mundial (Dowling et al., 2020), o *Bipolaris* sp. (Figura 8), um fitopatógeno de espécies de gramíneas de alto interesse agrônômico (Manamgoda et al., 2014; de Paula et al. 2022) e o *Sphaceloma* sp (Figura 10), o agente causador do superalongamento da mandioca e da doença do feijão-caupi, principal cultura de exporte da Uganda (Afutu et al., 2017).

Figura 11: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida para os testes de antagonismo por cultura dupla contra fitopatógenos. O eixo x é representativo da Porcentagem de inibição (%) enquanto o eixo y representa os fitopatógenos. As porcentagens de inibição obtidas foram: *Alternaria alternata* (50,00%); *Bipolaris* sp. (61,67%); *Ceratocystis paradoxa* (0%); *Colletotrichum* sp. (79,67%); *Lasiodiplodia euphorbicola* (41,17%); *L. pseudotheobromae* (32,20%); *Rhizopus microsporus* (39,17%); *Sclerotinia sclerotium* (0%) e *Sphaceloma* sp. (70,67%).

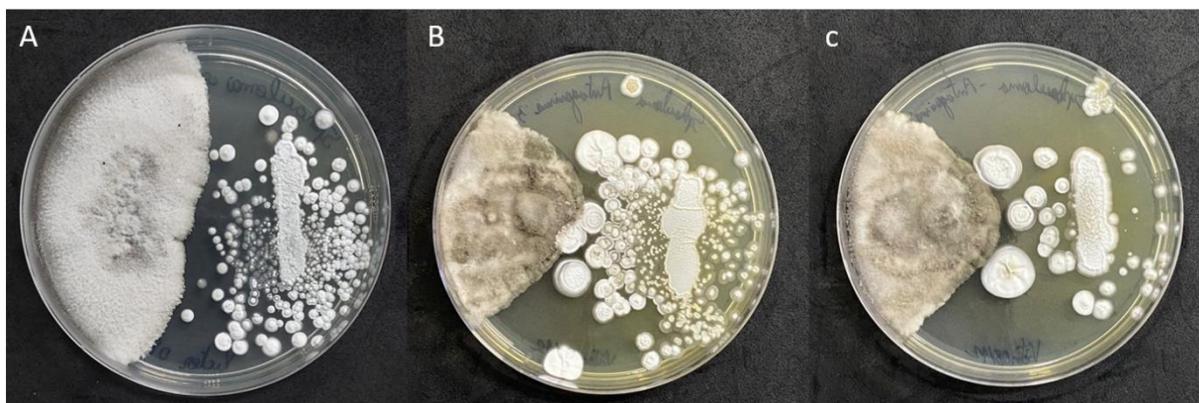


Fonte: Elaborado pelo autor.

No caso específico do *Sphaceloma* sp., é possível notar nos ensaios a presença de colônias satélite (destacas pelas setas amarelas) que aparentam germinar da massa original da colônia de *Streptomyces* sp. MG04. Para verificar se tal fato teria sido resultado de um erro experimental, o ensaio foi repetido mais duas vezes (Figura 12) usando de placas distintas de *Sphaceloma* incubadas por 14 dias e duas suspensões de esporos coletadas de duas placas de MG04 distintas também

incubadas por 14 dias. É possível que a origem de tais colônias ainda se deva ao exato mesmo erro experimental sendo coincidentemente repetido em todos os ensaios, mas considerando que o mesmo efeito não foi notado em nenhum dos outros ensaios, talvez, este seja resultado de alguma interação ainda não documentada entre a cepa de *Streptomyces* sp. e o fungo *Sphaceloma* sp..

Figura 12: Repetições do ensaio de cultura dupla em *Sphaceloma* sp. com três suspensões de esporos distintas e três discos de fungo proveniente de diferentes placas, demonstrando a germinação de colônias avulsas.



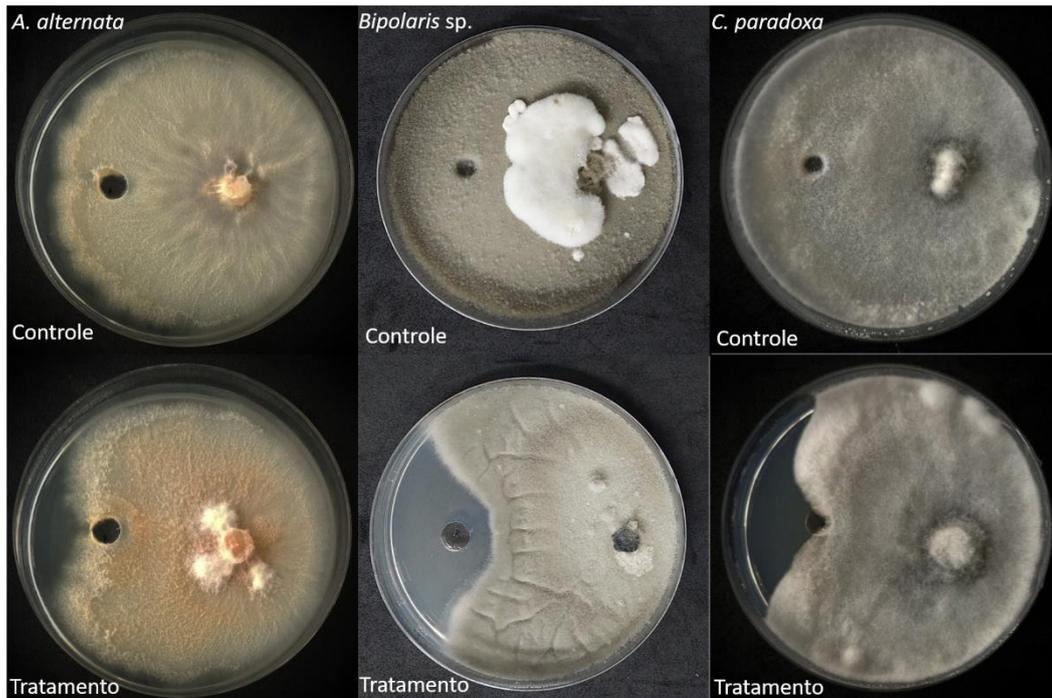
Fonte: Registrado pelo autor.

5.3 Potencial antagonístico do filtrado por difusão em ágar

Uma das principais características do gênero *Streptomyces* é sua capacidade de produção de metabólitos de interesse antimicrobiano (Silva et al. 2022). Para avaliar o potencial de produção de possíveis metabólitos de interesse da cepa MG04, foi extraído o sobrenadante do cultivo líquido, onde compostos extracelulares são secretados pelas bactérias. O caldo bruto do cultivo foi filtrado por centrifugação e por membrana PES até se tornar completamente livre de células e injetado em um poço no ágar para que os componentes do filtrado pudessem se difundir (Krespach et al., 2023).

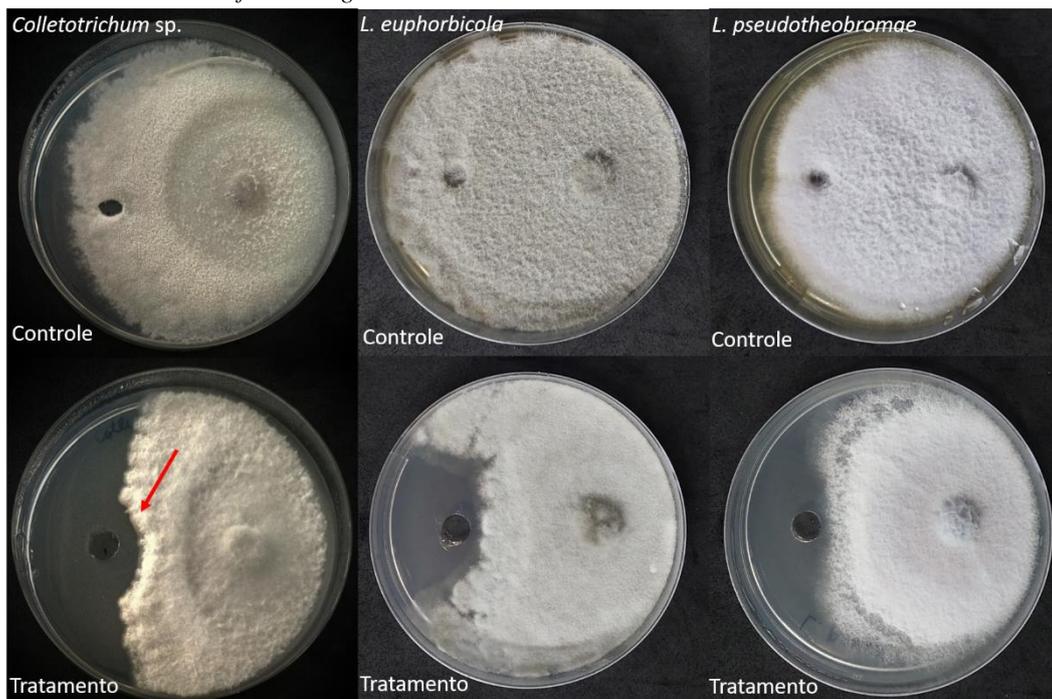
Por conta da taxa de difusão pelo meio, pela ausência de uma fonte produtora constante de novos compostos e por conta da ausência de estresses bióticos que podem incentivar as células a produzirem mais metabólitos secundários, a efetividade do filtrado por difusão é geralmente menor do que em um cultivo com células viáveis (Colombo et al., 2019; Devillers, Steiman & Seigle-Murandi, 1989). Essa tendência é observada nos resultados apresentados nas figuras 13, 14 e 15. Foi obtido porcentagens de inibição notavelmente menores, variando de 10,53% (*A. alternata*) até 53,57% (*Sphaceloma* sp.). Os resultados do percentual de inibição estão representados na Figura 16.

Figura 13: Testes de difusão do filtrado em poço de ágar contra os fungos *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp. e *Ceratocystis paradoxa*.



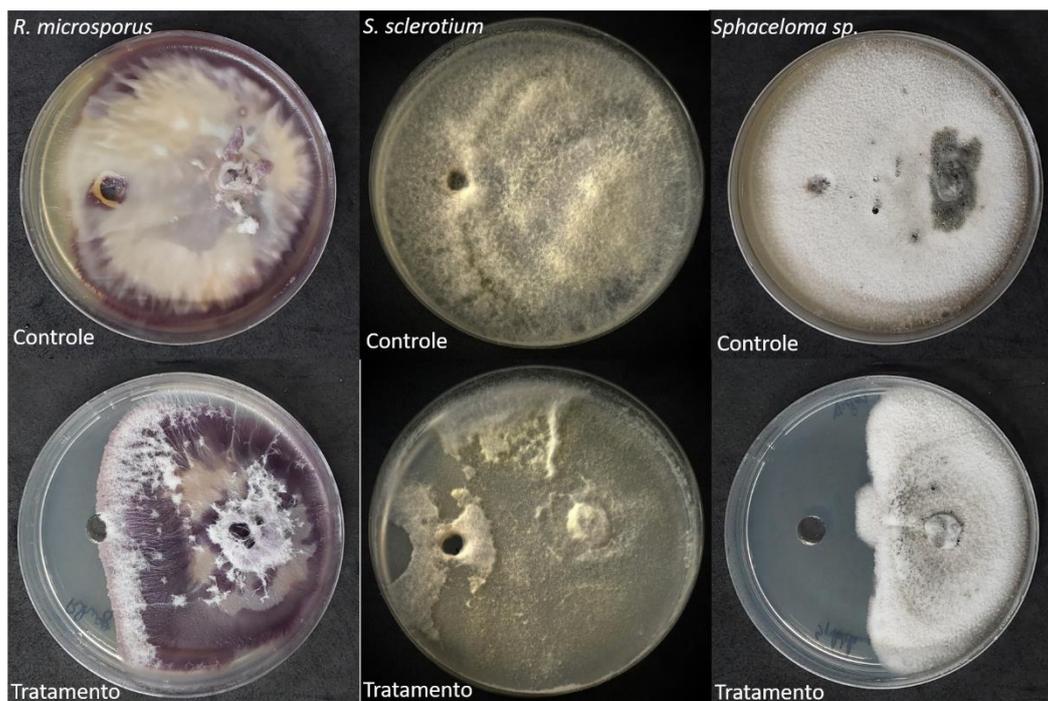
Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 14: Testes de difusão do filtrado em poço de ágar contra os fungos *Colletotrichum* sp, *Lasiodiplodia euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*. A seta vermelha indica a formação de um halo ao redor do poço de ágar, representativo de um maior efeito antagonístico local.



Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 15: Testes de difusão do filtrado em poço de ágar contra os fungos *Rhizopus microsporus*, *Sclerotinia sclerotium* e *Sphaceloma sp.*.

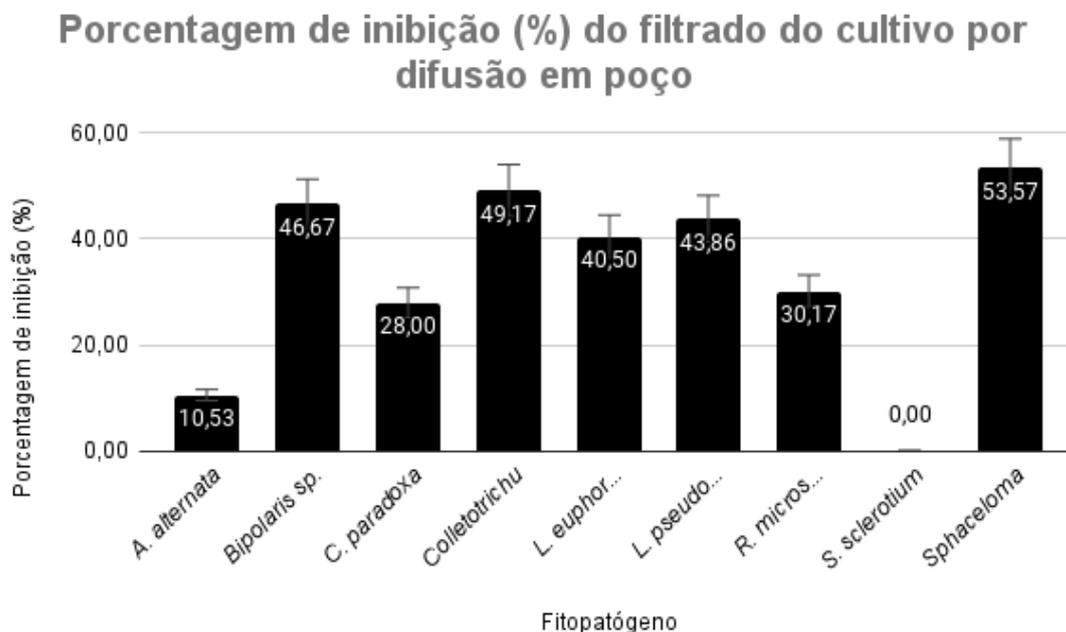


Fonte: Registrado pelo autor.

Nos resultados dos ensaios com *Colletotrichum sp.* (Figura 14), é possível notar a presença de um forte halo de inibição na proximidade do poço (destacado pela seta vermelha), que associada à redução do crescimento do micélio do fungo por grande parte da placa, pode sinalizar a existência de substâncias ativas antimicrobianas com diferentes propriedades físico-químicas e por consequência capacidades de difusão e distribuição do meio distintas (Choyam et al., 2015).

Destaque também aos resultados do antagonismo em *Lasiodiplodia euphorbicola* e *L. pseudotheobromae* (Figura 14). Ambas são espécies com potencial fitopatogênico, mas também conhecidas por colonizarem endofiticamente certas espécies vegetais, apenas exercendo atividade patogênica mediante a estresse ou sinalização externa (Segaran & Sathiavelu, 2023). Esses microrganismos são, portanto, também conhecidos por produzirem certos compostos antimicrobianos (Wei et al., 2014) e atuarem no controle de certas doenças. Por tais motivos, é possível que ambas produzam compostos inibitórios no meio, que resultem na inibição do *fitness* do *Streptomyces* e consequente diminuição da atividade antimicrobiana. Hipótese essa corroborada pelo crescimento mais vigoroso observado nos testes de cultura dupla, onde ambas as cepas começaram a contornar a parede de *Streptomyces sp.*

Figura 16: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida para os testes de antagonismo por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra os fitopatógenos. O eixo x é representativo da Porcentagem de inibição (%) enquanto o eixo y representa os fitopatógenos. As porcentagens de inibição obtidas foram: *Alternaria alternata* (10,53%); *Bipolaris sp.* (46,67%); *Ceratocystis paradoxa* (28%); *Colletotrichum sp.* (49,17%); *Lasiodiplodia euphorbicola* (40,50%); *L. pseudotheobromae* (43,86%); *Rhizopus microsporus* (30,17%); *Sclerotinia sclerotium* (0%) e *Sphaceloma sp.* (53,57%).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Presença e potencial antagônico de Compostos Orgânicos Voláteis

Os VOCs são grandes alvos de interesse para a indústria alimentícia por conta de seu grande potencial como biofumigantes na aplicação pós-colheita de safras agrícolas, no intuito de prevenir doenças, retardar o apodrecimento e a perda nutricional do vegetal, melhorando assim a aparência e o tempo de prateleira dos produtos (Dow et al., 2023; Carpenter et al., 2017; Morath et al., 2012). Outro fator que aumenta significativamente a procura por novos VOCs de interesse antimicrobiano é o fato de que a produção dos mesmos é intimamente ligada ao metabolismo intrínseco de cada microrganismo, resultando assim em uma diversidade considerável de compostos, bem como da proporção relativa dos mesmos empregados pelos microrganismos (Zhao et al., 2022).

Para avaliação da possível produção de VOCs e de seu respectivo impacto nos fungos fitopatogênicos no presente estudo, foi empregado uma metodologia de placa de Petri bipartida adaptada de Le et al. (2022). O intuito da placa dividida é impedir o contato direto entre os dois agentes orgânicos inoculados nos dois lados, seja por contato célula-célula ou por difusão de substâncias no meio. Sendo assim, desde que a mesma seja devidamente hermeticamente fechada,

os únicos compostos que terão impacto antagônico serão aqueles capazes de se volatilizar no ar (Kai, Vespermann, & Piechulla, 2008).

Os resultados da inibição dos compostos orgânicos voláteis estão representados na Figura 17. Não foi observado inibição significativa nos fungos *Ceratocystis paradoxa* (0,39%), *Sclerotinia sclerotium* (0,86%) e *Sphaceloma* sp. (0,17%). É provável que essas taxas de inibição tão próximas de zero sejam apenas decorrentes da variação de crescimento natural entre os discos do fungo, portanto, para todos os propósitos a inibição do *C. paradoxa*, *S. sclerotium* e *Sphaceloma* SP. será considerada como 0%. A tendência demonstrada pelos ensaios é que conforme as classes de moléculas e compostos se torna mais restrita e a quantidade de possíveis agentes com ação antifúngica diminui, também é diminuído o efeito inibitório observado. Entretanto, com exceção destes 3 fungos, todos os outros fitopatógenos testados apresentaram inibição no crescimento (Figuras 18, 19 e 20).

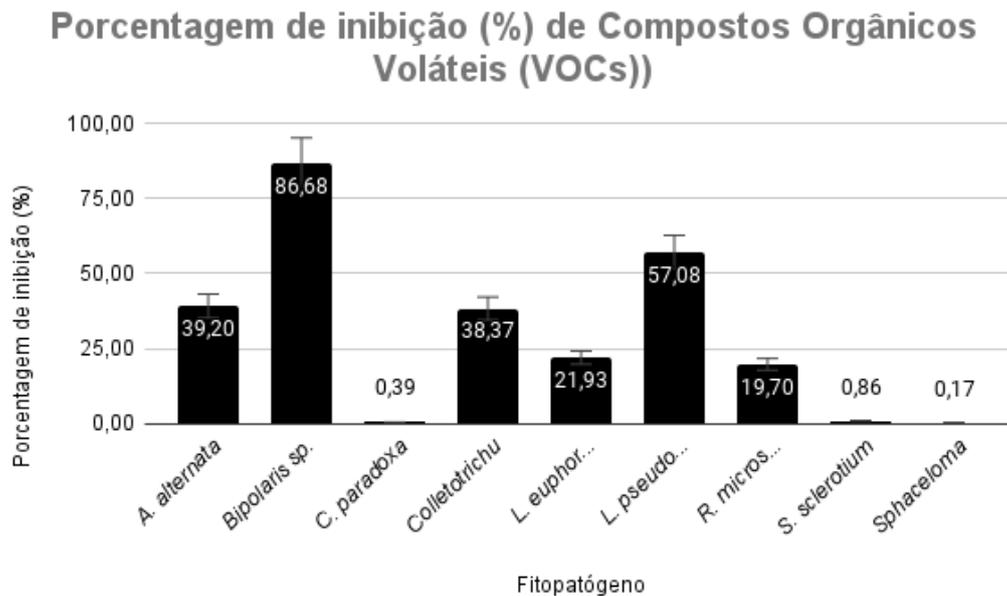
Apesar da maior restrição da quantidade de possíveis agentes antifúngicos, o maior valor de inibição entre todos os testes foi obtido nesta etapa de experimentos. O fungo *Bipolaris* sp. sofreu inibição de 86,68% praticamente não crescendo a partir da borda do disco do fungo. Essa interação marca o *Bipolaris* sp. como um possível alvo sensível à compostos voláteis e a estratégias de biofumigação.

Os outros fungos testados variaram de 19,70% a 57,08%. Sendo o *Lasiodiplodia euphorbicola* e *R. microsporus* os que apresentaram menor resistência aos compostos voláteis presentes no meio enquanto o *L. pseudotheobromae* apresentou a maior inibição entre todos os seus outros resultados, reforçando a hipótese que o resultado com baixo potencial antifúngico observado no teste de cultura dupla era decorrente de uma interação inibitória do fungo contra o *Streptomyces* sp..

5.5 Escolha da Fonte de Carbono e Nitrogênio por meio do potencial antifúngico

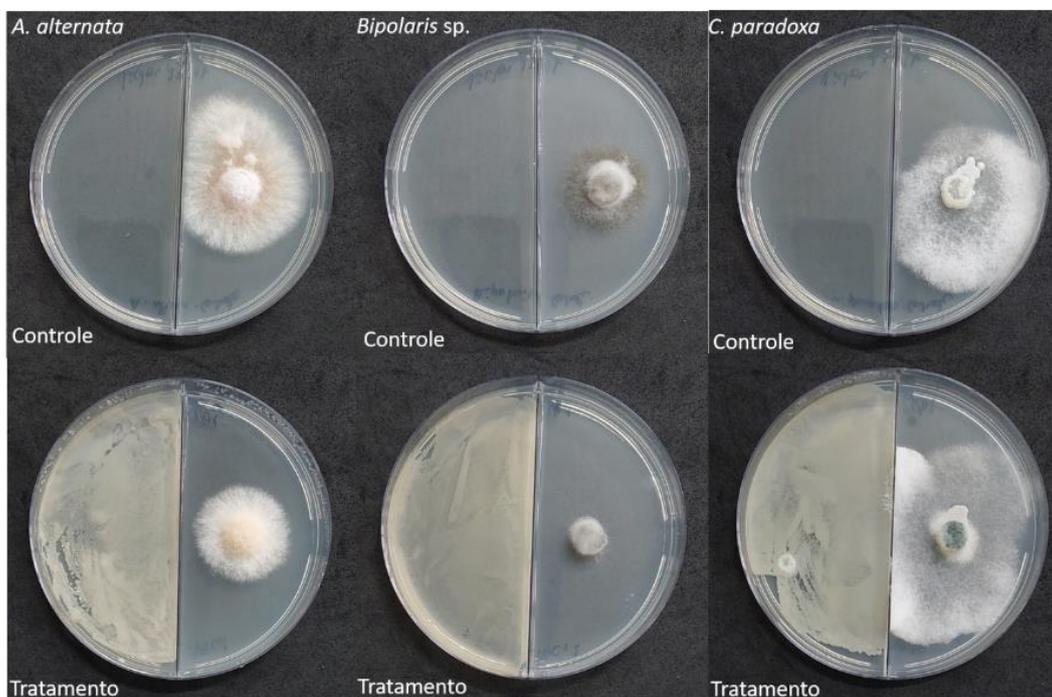
Existe extenso respaldo na literatura dos impactos da fonte de carbono e nitrogênio nos mais diversos parâmetros de crescimento celular e produção de metabólitos secundários (Pandey et al., 2005; Moreira et al., 2020; Volker e Altaba, 2001). Tais fatores estão intimamente relacionados a regulação das vias metabólicas internas que levam a produção dos compostos de interesse e alterar tanto a identidade quanto quantidade das fontes de alimentação para a cultura pode resultar em mudanças drásticas no perfil metabolômico (Thakur et al., 2009). No intuito de avaliar a proporção Carbono/Nitrogênio na etapa seguinte do experimento, foi primeiramente analisado o papel individual de cada fonte candidata.

Figura 17: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida para os testes de presença e potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis produzidos por *Streptomyces* sp. contra fitopatógenos. O eixo x é representativo da Porcentagem de inibição (%) enquanto o eixo y representa os fitopatógenos. As porcentagens de inibição obtidas foram: *Alternaria alternata* (39,20%); *Bipolaris* sp. (86,68%); *Ceratocystis paradoxa* (0,39%); *Colletotrichum* sp. (39,37%); *Lasiodiplodia euphorbicola* (21,93%); *L. pseudotheobromae* (57,08%); *Rhizopus microsporus* (19,70%); *Sclerotinia sclerotium* (0,86%) e *Sphaceloma* sp. (0,17%)



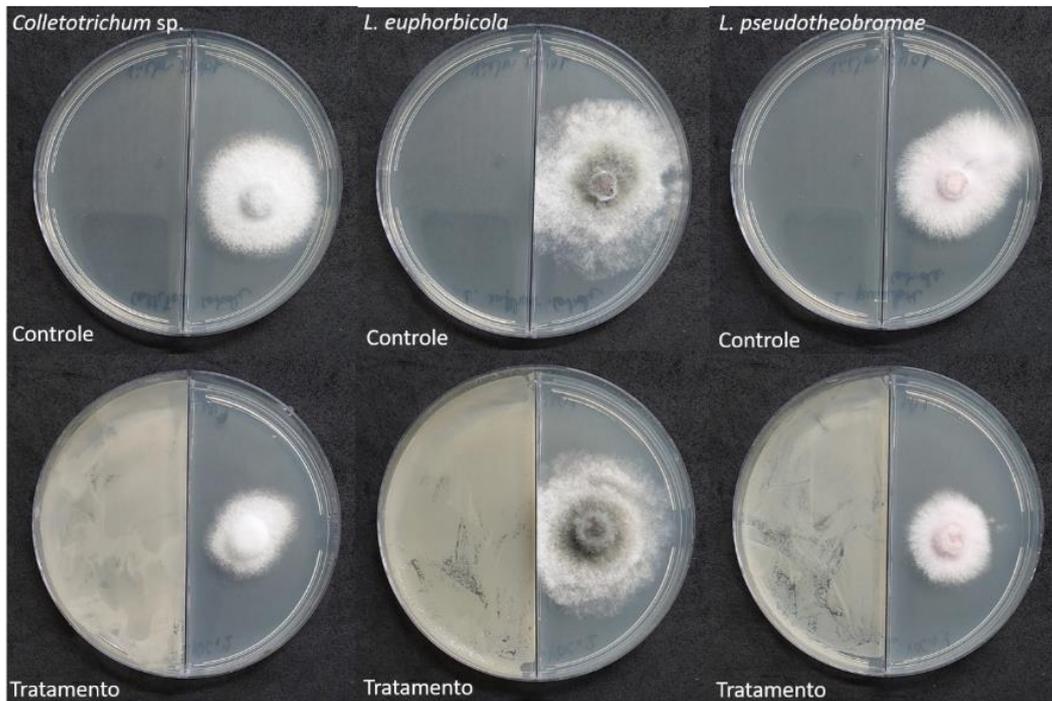
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18: Testes do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis contra os fungos *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp. e *Ceratocystis paradoxa*.



Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 19: Testes do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis contra os fungos *Colletotrichum sp.*, *Lasiodiplodia euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*.



Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 20: Testes do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis contra os fungos *Rhizopus microsporus*, *Sclerotinia sclerotium* e *Sphaceloma sp.*.

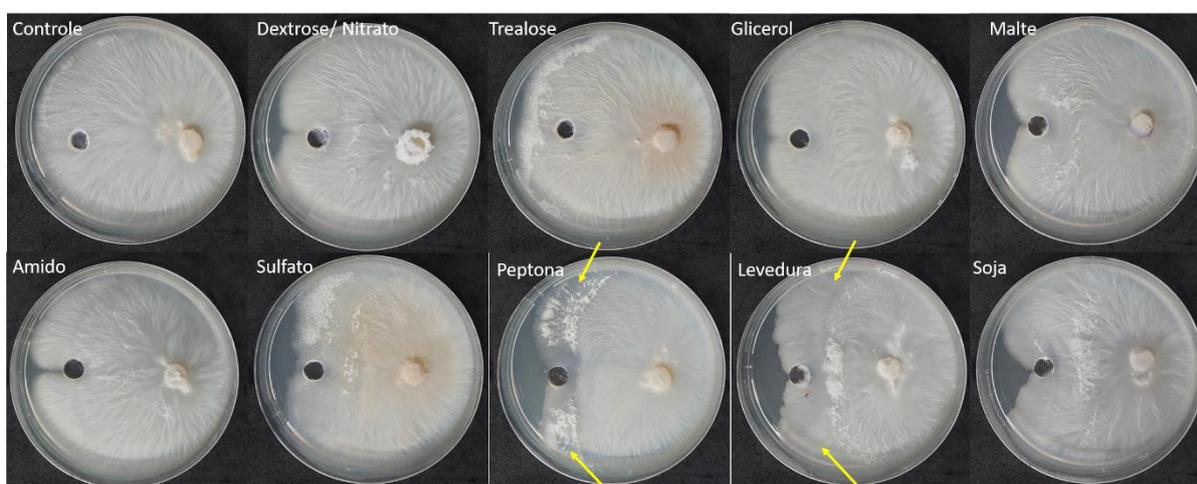


Fonte: Registrado pelo autor.

Foram escolhidas as 5 fontes de carbono e 5 de nitrogênio conforme apresentado na Tabela 4, os cultivos foram incubados e o teste de difusão de filtrado celular em poço ágar foi realizado conforme a metodologia previamente apresentada. Por questão de adequação do volume experimental ao escopo deste trabalho, foram selecionados apenas 2 fungos como agentes de teste para esta etapa de ensaios. O *Colletotrichum* sp. foi escolhido como um dos fitopatógenos por conta de sua maior inibição frente as propriedades antifúngicas da cepa MG04, observado nos resultados anteriores, tornando-o mais sensível para mudanças no perfil metabolômico antifúngico mediante as alterações do meio de cultivo, além de ser o fitopatógeno de maior interesse comercial ou importância em termos de perda economica. (Dean et al., 2012).

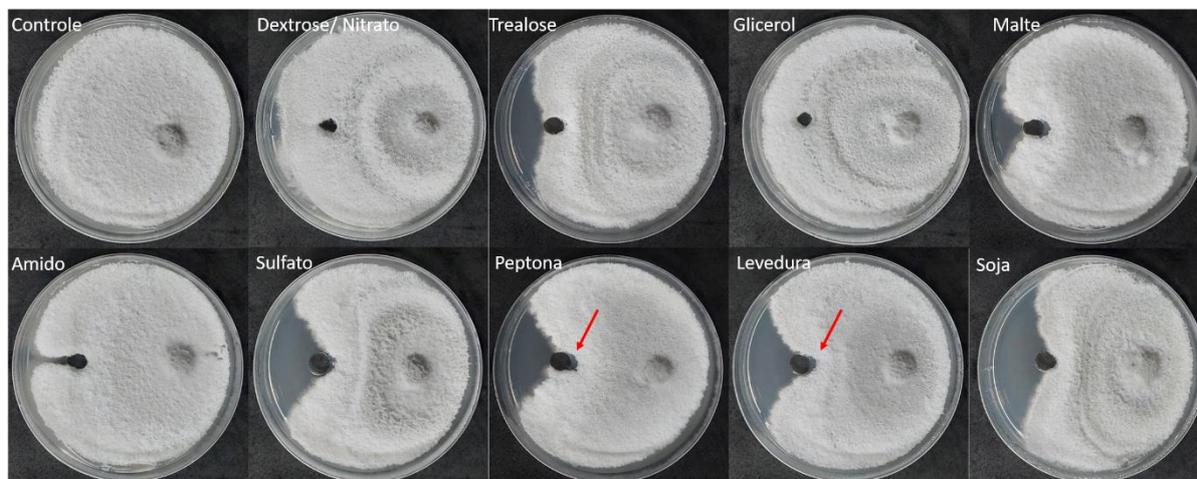
O *Alternaria alternata*, por outro lado, foi selecionado para este ensaio pelo motivo oposto, sendo um dos fungos que apresentou menor inibição aparente nos testes por compostos do filtrado celular, ele foi escolhido no intuito de observar tanto o efeito das mudanças das condições de cultivo em fungos com maior resistência aos compostos quanto possivelmente servir de indicador para a presença da produção de metabólitos da qual o *Colletotrichum* apresenta menor sensibilidade. Os resultados da inibição estão representados na Figura 21 para *A. alternata* e na Figura 22 para *Colletotrichum* sp..

Figura 21: Placas de Petri dos ensaios de antagonismo assistido por OSMAC, alterando a fonte de carbono e nitrogênio e observando o impacto no potencial antagônico por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra o fungo A. alternata. As fontes utilizadas no ensaio foram: Dextrose, Trealose, Extrato de Malte, Glicerol e Amido. Da mesma forma, as fontes de nitrogênio analisadas foram: Nitrato de Potássio (KNO_3), Sulfato de Amônia ($(NH_4)_2SO_4$), Peptona Bacteriológica, Extrato de Levedura e Extrato de Soja. As setas em amarelo destacam as áreas das placas onde foi possível observar diminuição da espessura micelial por conta do efeito antagônico.



Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 22: Placas de Petri dos ensaios de antagonismo assistido por OSMAC, alterando a fonte de carbono e nitrogênio e observando o impacto no potencial antagonístico por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra o fungo *Colletotrichum* sp.. As fontes utilizadas no ensaio foram: Dextrose, Trealose, Extrato de Malte, Glicerol e Amido. Da mesma forma, as fontes de nitrogênio analisadas foram: Nitrato de Potássio (KNO_3), Sulfato de Amônia ($(NH_4)_2SO_4$), Peptona Bacteriológica, Extrato de Levedura e Extrato de Soja. As setas vermelhas destacam as áreas onde é possível observar a presença de um pequeno halo de aproximadamente 0,2 cm ao redor dos poços de ágar.

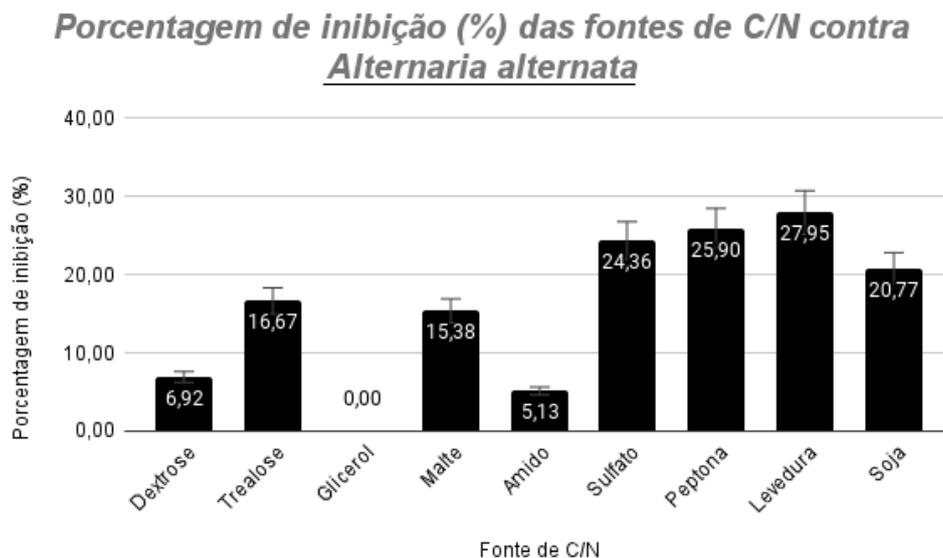


Fonte: Registrado pelo autor.

Como observado nas figuras, os resultados da inibição foram, no geral, menores para as fontes de carbono do que para as fontes de nitrogênio, indicando que o nitrogênio pode ser um fator de maior impacto nas propriedades antifúngicas, que o KNO_3 utilizado nas fontes de carbono pode resultar em um efeito negativo na variável resposta, ou que as fontes de carbono selecionadas podem estar interferindo em algum outro fator não observado. O fato da fonte de Dextrose com KNO_3 apresentar porcentagem inibitória severamente abaixo da média (2,7% em *Colletotrichum* e 6,9% em *A. alternata*) pode dar credência à segunda hipótese, enquanto a porcentagem de inibição não observável em *A. alternata* e de 5,4% em *Colletotrichum* pode ser indicativo de uma maior possibilidade da terceira, considerando que o glicerol pode, em alguns casos, apresentar propriedades deletérias para o crescimento celular, para a disponibilidade de água no meio e para a viabilidade da biomassa total (Pinto et al., 2004).

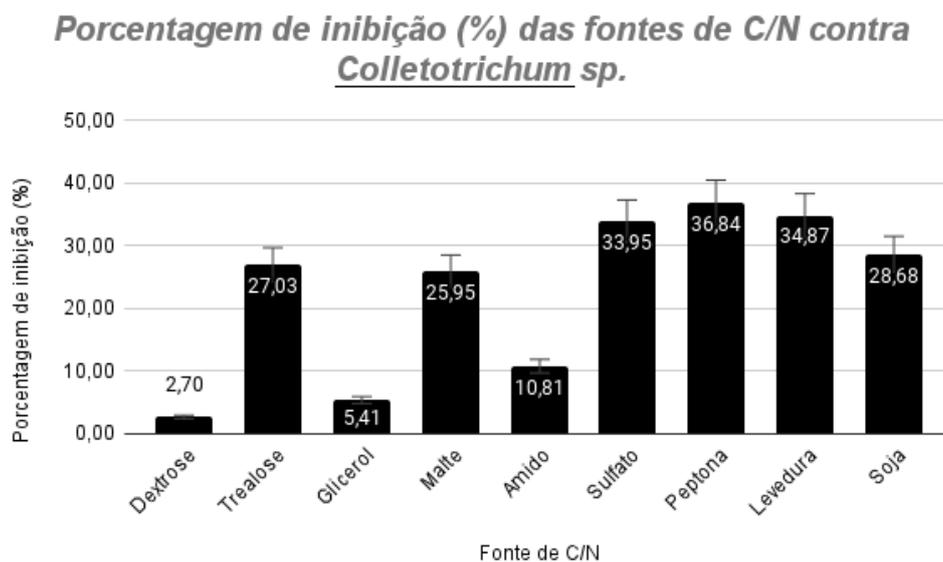
A porcentagem de inibição obtida através da metodologia descrita no item 4.5 estão representadas na Figura 23 para *A. alternata* e na Figura 24 para *Colletotrichum* sp..

Figura 23: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida nos testes de antagonismo por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra *A. alternata* para cada fonte de carbono e nitrogênio testado. O eixo x é representativo do Potencial de inibição (%), enquanto o eixo y representa as diferentes fontes de carbono e nitrogênio: Dextrose (6,92%), Trealose (16,67%), Extrato de Malte (15,38%), Glicerol (0%), Amido (5,13%), Nitrato de Potássio (6,92%), Sulfato de Amônia (24,36%), Peptona Bacteriológica (25,90%), Extrato de Levedura (27,95%) e Extrato de Soja (20,77%).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24: Representação em colunas da porcentagem de inibição obtida nos testes de antagonismo por difusão do filtrado de cultivo em poço de ágar contra *Colletotrichum sp.* para cada fonte de carbono e nitrogênio testado. O eixo x é representativo do Potencial de inibição (%), enquanto o eixo y representa as diferentes fontes de carbono e nitrogênio: Dextrose (2,7%), Trealose (27,03%), Extrato de Malte (25,95%), Glicerol (5,41%), Amido (10,81%), Nitrato de Potássio (2,70%), Sulfato de Amônia (33,95%), Peptona Bacteriológica (36,84%), Extrato de Levedura (34,87%) e Extrato de Soja (28,68%).

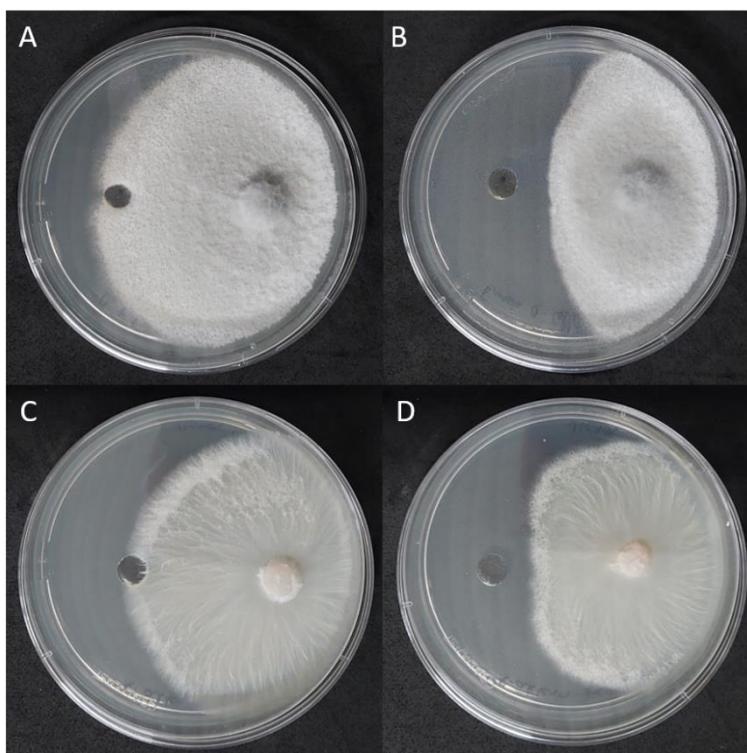


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os melhores resultados para fonte de Carbono foram observados no uso da trealose (27% em *Colletotrichum* e 16,8% em *A. alternata*) e do extrato de malte (25,9% em *Colletotrichum* e 15,4% em *A. alternata*). Apesar do maior uso na literatura do extrato de malte, a trealose foi escolhida como fonte de carbono para a próxima etapa devido ao seu potencial osmorregulatório (Hounsa et al., 1998), seus impactos positivos na viabilidade celular (Silljé et al., 1999) e de sua maior porcentagem de inibição observada. Os melhores resultados para fonte de Nitrogênio foram observados na peptona bacteriológica (36,84% em *Colletotrichum* e 25,9% em *A. alternata*) e no extrato de levedura (34,87% em *Colletotrichum* e 27,9% em *A. alternata*), além disso, foi possível observar nestes dois ensaios a presença de um halo de 0,2 cm ao redor dos poços no teste contra *Colletotrichum* (destacados pelas setas vermelhas) e uma diminuição visível da espessura micelial em *A. alternata* (destacado pelas setas amarelas) na proximidade dos mesmos. Como neste caso os compostos de maior inibição foram diferentes entre os dois fitopatógenos, o fator decisivo para a seleção para a próxima etapa foi a incidência dos mesmos na literatura, da qual o extrato de levedura aparentou ser mais utilizado tanto em ensaios de otimização de meio (Ramirez-Rodriguez et al., 2018; Krysenko, 2023; Le et al., 2022), quanto em meios padrão para crescimento de *Streptomyces* sp. (Shepherd et al., 2010).

No intuito de investigar a possibilidade de interações prejudiciais entre as fontes escolhidas que poderiam prejudicar a viabilidade celular e o potencial antifúngico, foi realizado um ensaio preliminar nos mesmos parâmetros de cultivo, com os mesmos componentes de meio, porém com a adição da trealose e do extrato de levedura nas mesmas concentrações. O crescimento micelial foi mensurado e a porcentagem de inibição calculada segundo a metodologia discutida no item 4.5. Foi obtido percentual de inibição de 50,35% para *Colletotrichum* sp. e de 33,8% para *A. alternata* (Figura 25), resultado superior aos outros ensaios de teste para fonte de carbono e nitrogênio e superior até mesmo aos resultados obtidos no cultivo padrão de ISP-2 observados no item 5.3 no caso do *Colletotrichum* sp. Sendo assim, é possível afirmar que as fontes selecionadas não aparentam apresentar efeito negativo quando usadas em conjunto e que as mesmas podem ser escolhidas para a próxima etapa de testes.

Figura 25: Placas de Petri do antagonismo por difusão do filtrado celular em poço de ágar contra *Colletotrichum* sp. e *A. alternata* do Ensaio 0, contendo a fonte de carbono (trealose) e de nitrogênio (extrato de levedura) selecionados. A) placa controle do fungo *Colletotrichum* sp., contendo apenas o disco do fungo; B) placa tratamento do *Colletotrichum* sp., contendo o disco e o poço com filtrado celular; C) placa controle do fungo *A. alternata*, contendo apenas o disco do fungo; D) placa tratamento do *A. alternata*, contendo o disco e o poço com filtrado celular.



Fonte: Registrado pelo autor.

5.6 Monitoramento das variações no potencial antagônico por metodologia OSMAC assistida

A otimização efetiva dos parâmetros de cultivo para um organismo específico requer várias etapas para obtenção e interpretação de dados fidedignos. O PDB é uma das possíveis etapas de triagem inicial usado para apontar os fatores mais importantes no começo da fase de experimentação. Entretanto, apesar de ser possível estimar se os parâmetros de cultivo estão próximos de uma condição ótima através da análise da curvatura dos efeitos, o PDB sozinho é incapaz de calcular a otimização plena dos parâmetros de cultivo (Li et al., 2016). Para tanto, seria necessário a implementação de métodos estatísticos mais complexos, como o Delineamento Composto Central Rotacional ou a expansão do PDB para um método de Fatorial Fracionado utilizando-se dos parâmetros de maior efeito nele obtido (Neu, 2022; Li et al., 2016). Por fim, seria necessário ainda fornecer evidências de que a metodologia desenvolvida pela análise estatística realmente é responsiva e efetiva por meio dos mais diversos parâmetros, como por exemplo: eletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade e exatidão (Neu, 2022; Inmetro, 2020). Devido ao grande volume experimental, arcabouço de materiais, ferramentas

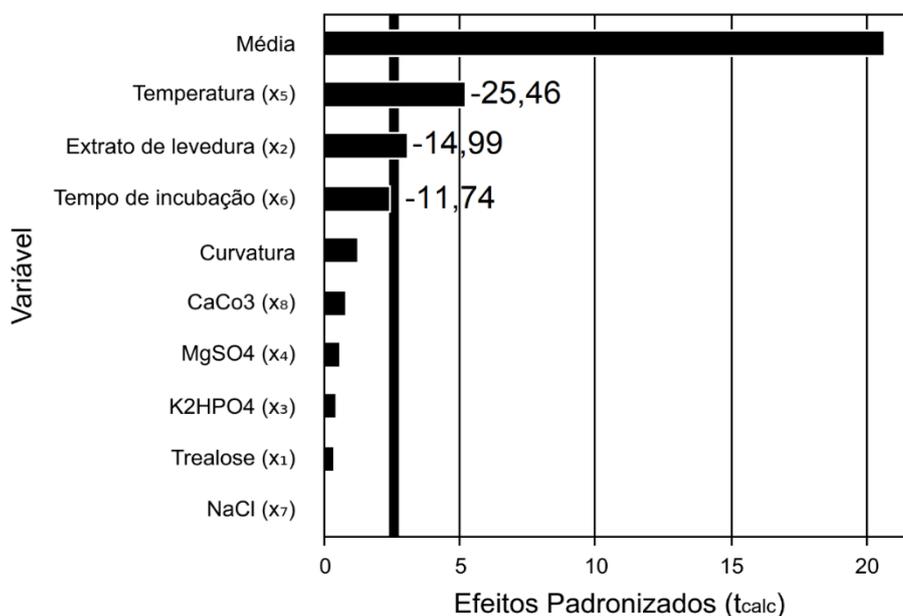
e técnicas, além da aptidão tanto experimental quanto estatística necessária para a realização de tal objetivo, foi determinado que a otimização plena dos parâmetros de cultivo escapava do escopo deste trabalho, e o PDB e suas metodologias auxiliares foram aplicadas como ferramentas de triagem inicial para determinação dos principais efeitos nos parâmetros de cultivo.

Após a definição da fonte de carbono e nitrogênio, a quantidade dos componentes e as condições do meio de cultivo foram variadas conforme a Tabela 5. Os 15 ensaios foram incubados pelo tempo indicado, o caldo bruto do cultivo foi filtrado e foi realizado teste de difusão de filtrado celular em poço ágar conforme a metodologia previamente apresentada. O *Colletotrichum* sp. e o *Alternaria alternata* foram selecionados novamente como fitopatógenos alvo para o antagonismo e foi observado o crescimento em placas de Petri.

5.6.1 Análise estatística dos ensaios contra *Colletotrichum* sp.

A análise estatística dos dados obtidos variando as condições e componentes do cultivo descritos no item 4.7.2, indica que, para o fungo *Colletotrichum* sp., duas das variáveis testadas foram significativas para o potencial antifúngico do caldo de cultivo filtrado. Na Figura 26 é possível observar um gráfico de Pareto representando o comportamento de cada variável, sendo que o comprimento de cada barra é diretamente proporcional ao valor do efeito principal calculado para cada variável, ao mesmo tempo a linha vertical indica um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), usado como padrão mínimo para que uma variável possa ser considerada como relevante.

Figura 26: Gráfico de Pareto e nível de significância do Plackett-Burman para a variável resposta "potencial antifúngico contra *Colletotrichum* sp.". As variáveis analisadas estão dispostas no eixo x do gráfico, organizadas em ordem crescente em função de seu efeito direto na variável resposta. O risco preto observado entre 0 e 5 do eixo y é o limite mínimo de nível de confiança de 95%. As variáveis de significância foram destacadas pelo seu efeito relativo na variável resposta, sendo elas a Temperatura (-25,46) e o Extrato de levedura (-14,99). O tempo de incubação (-11,74) também foi destacado por se aproximado do nível de confiança estabelecido.



Fonte: Adaptado do software Protimiza Experimental Design.

O delineamento pelo software demonstrou que a temperatura do cultivo e a concentração de extrato de levedura foram as variáveis com efeito mais significativo ($p < 0,05$) para a variável resposta analisada pelo potencial antifúngico contra o fitopatógeno. Ambas as variáveis apresentaram um efeito negativo na variável resposta, valores de, respectivamente, -25,46 e -11,74. Esses valores são indicativos de que concentrações menores de extrato de levedura e que temperaturas menores tendem a ter resultados melhores no antagonismo do filtrado. O tempo de incubação pode também se mostrar como uma variável de interesse mediante repetição dos testes devido ao seu maior nível de confiança quando comparado aos outros fatores observados, mas para os ensaios observados não foi possível confirmar seu efeito significativo com $\alpha = 5\%$.

Os dados obtidos foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA). Os resultados calculados no software Protimiza Experimental Design indicam que a curvatura não foi estatisticamente significativa com $p = 0,27$ para qualquer uma das respostas analisadas, indicando assim que nenhuma das variáveis avaliadas está em sua condição ideal (Tabela 7).

Tabela 7: Efeitos estimados, Erro padrão, t calculado e p -value de cada variável dos ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann no potencial antifúngico contra *Colletotrichum sp.*.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	50,5908	2,4469	20,6752	0,0000
Curvatura	-13,3083	10,9430	-1,2161	0,2782
Trealose (x_1)	-1,7150	4,8939	-0,3504	0,7403
Extrato de levedura (x_2)	-14,9850	4,8939	-3,0620	0,0280
K_2HPO_4 (x_3)	-2,0750	4,8939	-0,4240	0,6892
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (x_4)	2,9517	4,8939	0,6031	0,5727
Temperatura (x_5)	-25,4583	4,8939	-5,2021	0,0035
Tempo de incubação (x_6)	-11,7417	4,8939	-2,3993	0,0617
NaCl (x_7)	0,3717	4,8939	0,0759	0,9424
$CaCO_3$ (x_8)	-4,0250	4,8939	-0,8225	0,4482

Valores aproximados para 4 casas decimais. As variáveis de maior impacto na variável resposta estão destacadas em negrito. A coluna contendo o p -value referenciado no texto está destacada em cinza.

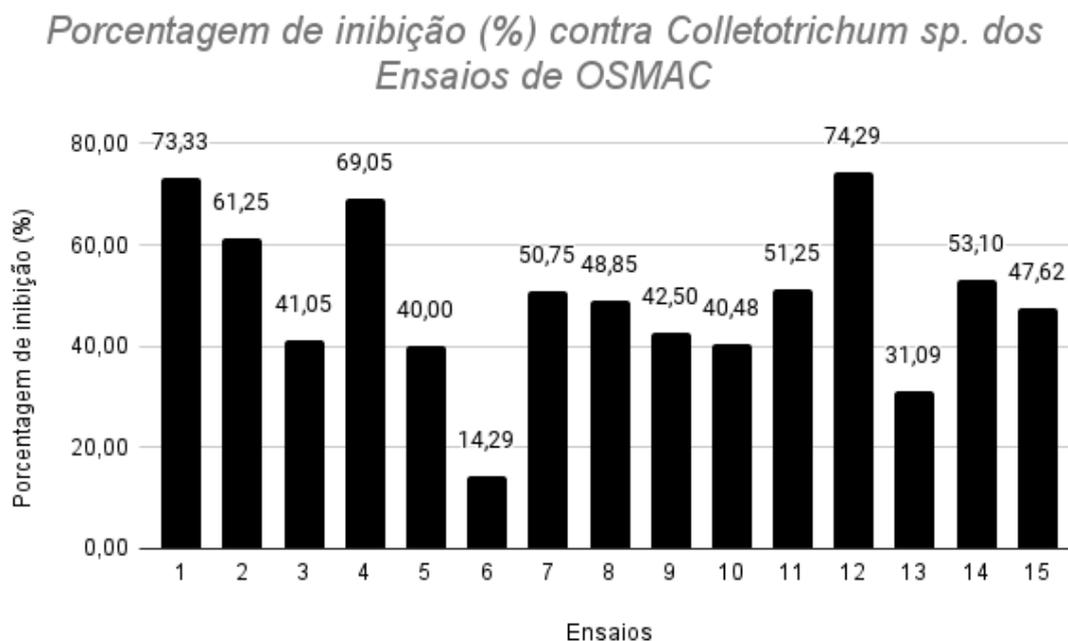
Fonte: Adaptado do software Protimiza Experimental Design.

Como é possível observar pelos resultados observados no gráfico da Figura 27 e nas placas de Petri incubadas por 7 dias mostradas na Figura 28, os ensaios de antagonismo por poço de ágar

tenderam a variar bastante dependendo dos parâmetros modificados. As menores inibições foram obtidas no ensaio 6 (14,29%) e no ensaio 13 (31,09%), enquanto as maiores foram obtidas no ensaio 1 (73,33%) e no ensaio 12 (74,29%).

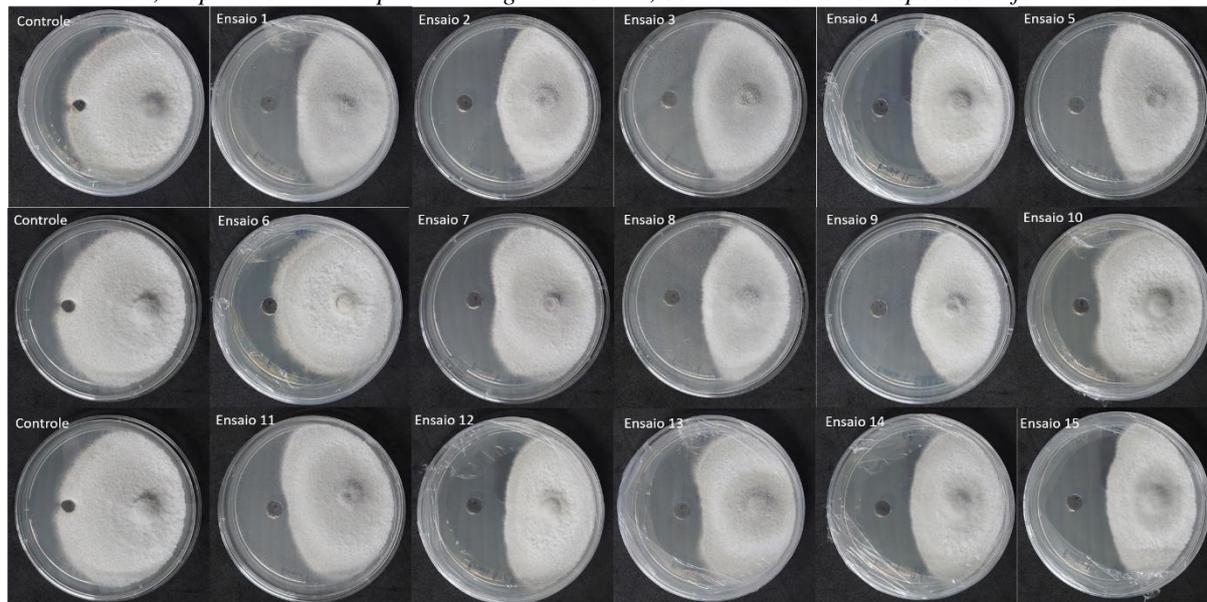
Apesar dos resultados do PBD indicarem que a temperatura do cultivo e a concentração de extrato de levedura são variáveis de interesse, os resultados separados do antagonismo podem indicar uma tendência preocupante. Os ensaios 13 a 15 são as triplicatas referentes ao ponto central do PBD (Tabela 6), incubadas sob os exatos mesmos parâmetros, portanto, suas respostas deviam ser o mais próximas possível. Contrário à expectativa, é possível observar uma diferença de aproximadamente 22,01% entre o menor e maior resultado na inibição do ponto central. Essa variância considerável pode ser indicativa de erro experimental ou da influência de fatores não-considerados durante a elaboração dos parâmetros-teste, tais como: luminosidade, quantidade de oxigênio dissolvido ou osmolaridade do meio.

Figura 27: Representação em colunas da porcentagem de inibição por antagonismo de difusão do filtrado celular em poço de ágar contra Colletotrichum sp., obtida nos ensaios OSMAC assistido por Plackett-Burmann. O eixo x é representativo do Potencial de inibição (%), enquanto o eixo y representa os ensaios do Plackett-Burmann, organizados ordem crescente de seu respectivo número. Os resultados obtidos nos ensaios foram, respectivamente: 73,33%; 61,25%; 41,05%; 69,05%; 40%; 14,29%; 50,75%; 48,85%; 42,50%; 40,48%; 51,25%; 74,29%; 31,09%; 53,10% e 47,62%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28: Placas de Petri dos 15 ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann para antagonismo por difusão em poço de ágar contra o fungo *Colletotrichum* sp.. Na primeira coluna estão os 3 controles utilizados nos ensaios, cada um deles referente aos ensaios realizados com tempo de incubação de 7, 10.5 e 14 dias, respectivamente. A partir da segunda coluna, os resultados estão dispostos de forma crescente.



Fonte: Registrado pelo autor.

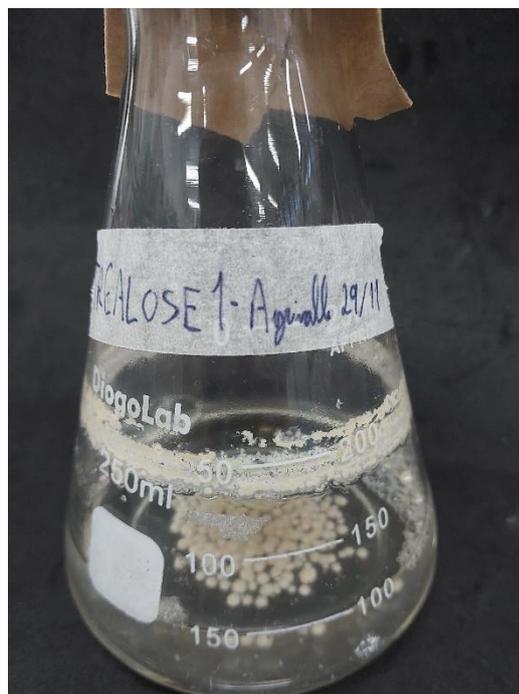
A possibilidade de que a quantidade de oxigênio dissolvido seja um fator influente é reforçada pelos resultados do PBD, pois menores temperaturas resultam em uma maior disponibilidade de oxigênio no meio celular em meios de cultura líquido (Somerville & Proctor, 2013), maiores quantidades de extrato de levedura adicionadas nos meios de cultivo resultaram em um meio mais turvo e com mais espuma (Figura 29), os tampões utilizados no lacre dos frascos de fundo arredondado não foram padronizados e poderiam apresentar capacidades de isolamento hermético distinto, os cultivos com a cepa MG04 tendem a formar colônias vigorosas nas paredes do frasco na altura da superfície (Figura 30), onde a disponibilidade de oxigênio é maior (Somerville & Proctor, 2013), e também pois nos estudos iniciais da produção de esporos utilizando *Streptomyces* sp. da cepa MG04, foi observado que a quantidade de esporos produzidos em 14 dias pode aumentar em até uma ordem de grandeza quando a cepa é inoculada na mesma quantidade de ISP-4 em um frasco Pyrex™ Erlenmeyer Wide-Neck 250 ml, que possui maior abertura, maior espaço interno e que por consequência proporciona uma melhor aeração para a cultura nele inoculada (Sundaramurthy, 2016). A relevância da quantidade de oxigênio dissolvido na expressão de certas propriedades antimicrobianas de *Streptomyces* sp. foi reportada por Mitrovic e colaboradores (2017), onde um maior diâmetro da zona de inibição contra os fungos *Alternaria alternata* e *Fusarium avenaceum* foi observado na maior taxa de mistura (200 rpm) de cultivo de *S. hygroscopicus*, indicando que uma maior transferência de oxigênio para as células resultou em um efeito positivo em seu potencial antifúngico.

Figura 29: Meios de cultivo dos Ensaios 11, 12 e 13 do Plackett-Burmann antes da inoculação com esporos. Os meios de cultivo dos ensaios 11, 12 e 13 foram preparados, respectivamente, com 5 g/L, 1 g/L e 3 g/L de extrato de levedura. É possível observar uma correlação entre turbidez do meio e a quantidade de extrato de levedura.



Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 30: Colônias que se formam na superfície do cultivo de *Streptomyces* sp. em um meio contendo Trealose após 7 dias.



Fonte: Registrado pelo autor.

Além disso, é importante ressaltar que uma das principais desvantagens do PBD é sua incapacidade de considerar a interação entre as variáveis de teste (Silva et al, 2013). Sendo assim, é possível que a variância observada seja resultado de interações entre os componentes e condições selecionadas. Nesse caso, o PBD não seria capaz de levar em consideração tais interações internas e como consequência as verdadeiras variáveis responsáveis pelo efeito antifúngico seriam relegadas para os resultados abaixo do nível de significância.

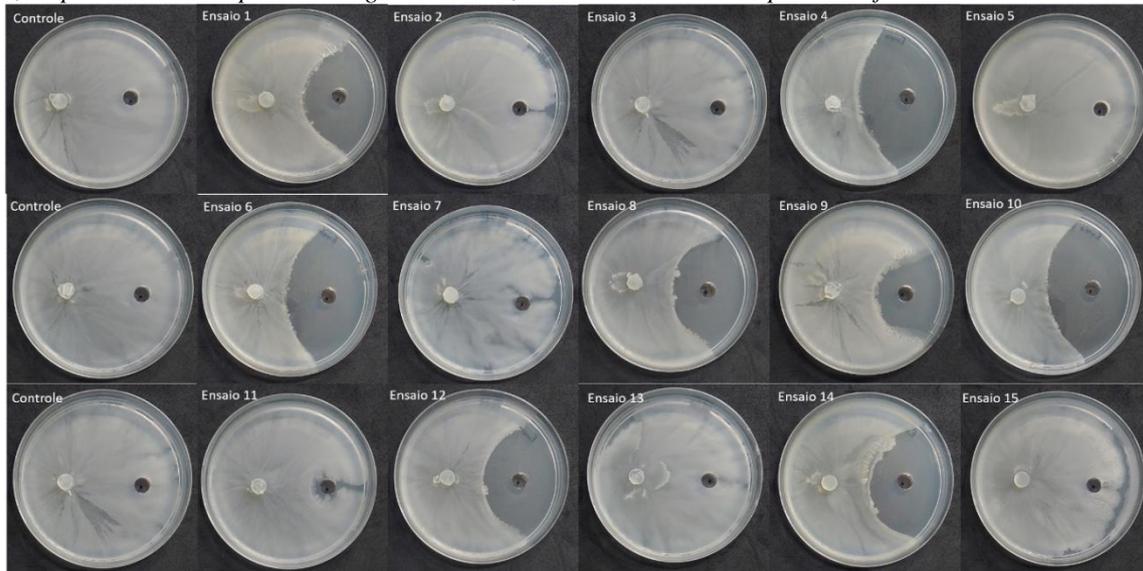
5.6.2 Análise estatística dos ensaios contra uma bactéria.

Os resultados do fungo *A. alternata* não foram responsivos para potencial antifúngico, pois a placa mãe de onde os discos de ágar foram extraídos foi contaminada por bactéria, como mostrado nos resultados da Figura 31. A bactéria em questão colonizou a placa mãe como um todo, causando ou a morte do fungo ou a depleção de sua carga micelial para um quantidade não-observável. Após 7 dias, o crescimento da contaminação proveniente dos discos parou completamente e permaneceu estável pelos próximos 7 dias, formando halos permanentes observados nas placas. Como resultado, todos os discos do fungo utilizados no teste do potencial antifúngico são na realidade representativos do potencial antibacteriano do filtrado de cultivo celular.

Os resultados do potencial antibacteriano relativo estão demonstrados na Figura 32. Como é possível observar, os resultados apresentaram tendencia aos extremos, com muitos dos ensaios apresentando potencial antibacteriano extremamente reduzido (Ensaio: 2, 3, 5, 7, 11, 13 e 15), enquanto outros apresentavam potencial extremamente alto (Ensaio: 1, 4, 6, 9, 10, 12 e 14), principalmente considerando que tais testes apresentaram halos permanentes, em contraste aos testes contra *Colletotrichum* sp., onde o filtrado celular demonstrou apenas capacidade de redução do crescimento fúngico.

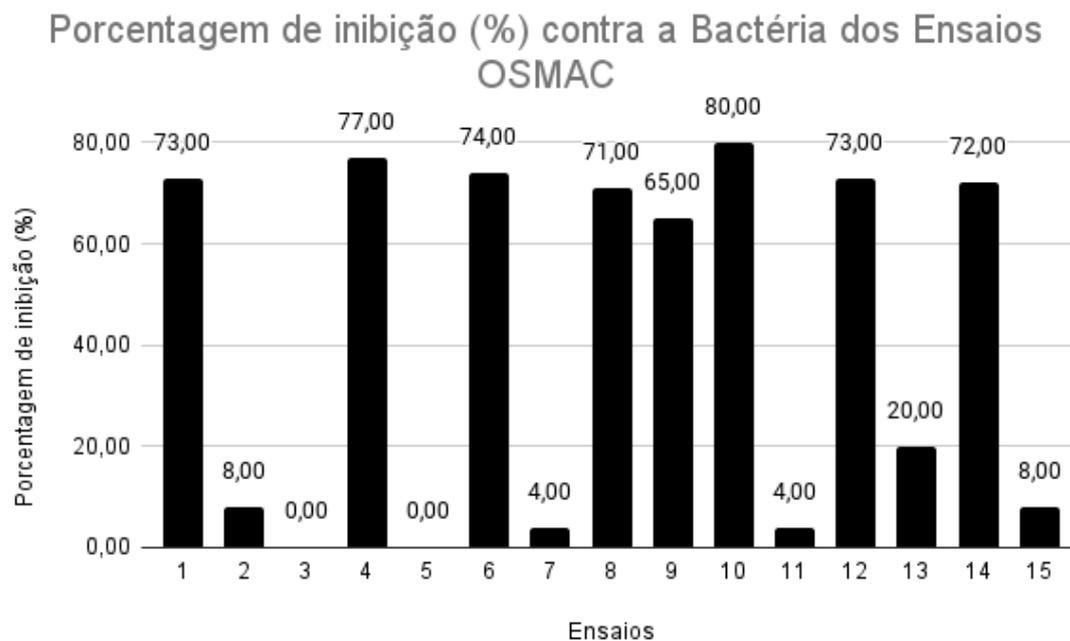
A análise estatística dos dados obtidos variando as condições e componentes do cultivo descritos no item 4.7.2, indica que, para a bactéria em questão, apenas o extrato de levedura (Efeito de -58,17) foi uma variável significativa para o potencial antibacteriano do caldo de cultivo filtrado. Esse valor é um forte indicativo de que concentrações menores de extrato de levedura tendem a resultar em melhoras significativas no antagonismo do filtrado. Na Figura 33 é possível observar um gráfico de Pareto representando o comportamento de cada variável, sendo que o comprimento de cada barra é diretamente proporcional ao valor do efeito principal calculado para cada variável, ao mesmo tempo a linha vertical indica um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Figura 31: Placas de Petri dos 15 ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann para antagonismo por difusão em poço de ágar contra o fungo *A. alternata*. Na primeira coluna estão os 3 controles utilizados nos ensaios, cada um deles referente aos ensaios realizados com tempo de incubação de 7, 10.5 e 14 dias, respectivamente. A partir da segunda coluna, os resultados estão dispostos de forma crescente.



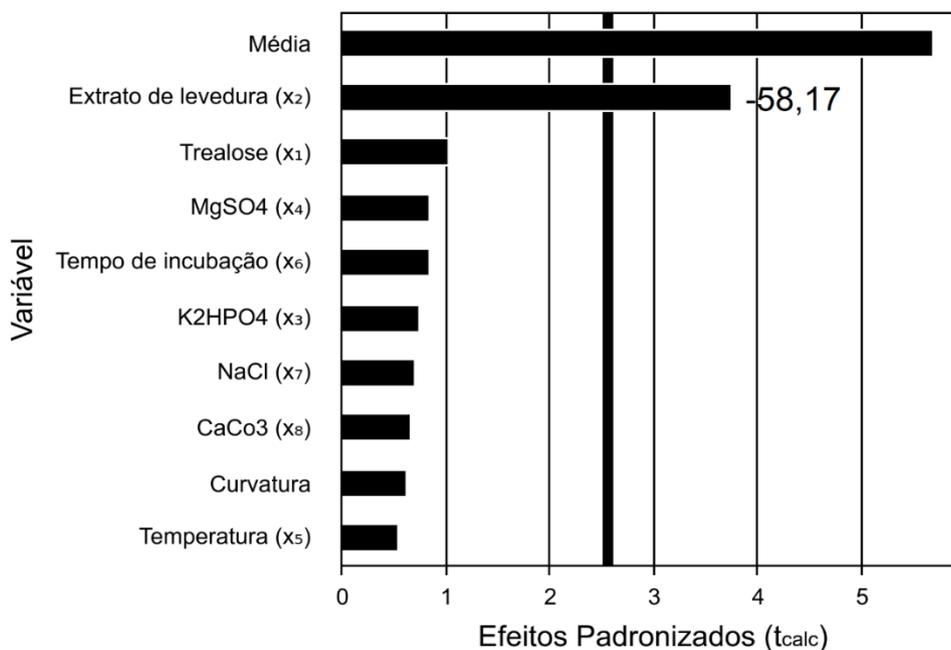
Fonte: Registrado pelo autor.

Figura 32: Representação em colunas da porcentagem de inibição por antagonismo de difusão do filtrado celular em poço de ágar contra *A. alternata*, obtida nos ensaios OSMAC assistido por Plackett-Burmann. O eixo x é representativo do Potencial de inibição (%), enquanto o eixo y representa os ensaios do Plackett-Burmann, organizados ordem crescente de seu respectivo número. Os resultados obtidos nos ensaios foram, respectivamente : 4%; 77%; 65%; 73%; 63%; 0%; 4%; 74%; 71,6%; 8%; 75,5%; 71%; 15%; 73% e 72%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33: Gráfico de Pareto e nível de significância do Plackett-Burman para a variável resposta "potencial antibacteriano". As variáveis analisadas estão dispostas no eixo x do gráfico, organizadas em ordem crescente em função de seu efeito direto na variável resposta. O risco preto observado entre 0 e 5 é o limite mínimo de nível de confiança de 95%. O extrato de levedura, como única variável de significância, foi destacado pelo seu efeito relativo na variável resposta (-58,17).



Fonte: Adaptado do software Protimiza Experimental Design.

Os dados obtidos foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA). Os resultados calculados no software Protimiza Experimental Design indicam que a curvatura não foi estatisticamente significativa com $p=0,85$ para qualquer uma das respostas analisadas, indicando assim que nenhuma das variáveis avaliadas está em sua condição ideal (Tabela 8).

A variação extrema entre as triplicatas do ponto central (13 a 15) pode reforçar a hipótese de que fatores de considerável impacto não estão sendo observados pelo PBD ou que existe interação entre os parâmetros selecionados. Entretanto, mediante observação do alto desvio padrão observado (21,31) nos ensaios e a completa falta de correlação entre os resultados obtidos no antagonismo contra *Colletotrichum* sp., é provável que a variação nos resultados seja decorrente do erro experimental associado à contaminação original da placa mãe.

Mesmo assim, é relevante notar uma forte correlação entre a diminuição da concentração de extrato de levedura no meio e um aumento direto e significativo do potencial antimicrobiano, pois a grande maioria dos ensaios com menor atividade antibacteriana pertencia também ao grupo de ensaios que recebeu uma maior concentração de extrato de levedura.

Tabela 8: Efeitos estimados, Erro padrão, *t* calculado e *p*-value de cada variável dos ensaios da metodologia OSMAC assistida por Plackett-Burmann no potencial antifúngico contra *A. alternata*.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	48,8417	10,6560	4,5835	0,0059
Curvatura	8,9833	47,6551	0,1885	0,8579
Trealose (x_1)	-22,6833	21,3120	-1,0643	0,3358
Extrato de levedura (x_2)	-2,8500	21,3120	-0,1337	0,8988
K ₂ HPO ₄ (x_3)	-24,3500	21,3120	-1,1425	0,3050
MgSO ₄ (x_4)	23,1833	21,3120	1,0878	0,3263
Temperatura (x_5)	-3,8167	21,3120	-0,1791	0,8649
Tempo de incubação (x_6)	-20,3167	21,3120	-0,9533	0,3842
NaCl (x_7)	-21,5167	21,3120	-1,0096	0,3590
CaCO ₃ (x_8)	3,0167	21,3120	0,1415	0,8930

Valores aproximados para 4 casas decimais. A variável de maior impacto na resposta está destacada em negrito.

A coluna contendo o *p*-value referenciado no texto está destacada em cinza.

Fonte: Adaptado do software Protimiza Experimental Design.

6. CONCLUSÃO

A cepa MG04 de *Streptomyces* sp. apresentou extenso potencial antifúngico, contra fungos fitopatógenos de interesse comercial e agrícola nos testes de antagonismo empregados.

No ensaio de antagonismo por cultura dupla em placa de Petri foram obtidos os melhores resultados gerais. A cepa não foi capaz de inibir *Ceratocystis paradoxa* ou *Sclerotinia sclerotium*, mas a menor porcentagem de inibição obtida nos fungos inibidos foi de 32,20% para o *Lasiodiplodia pseudotheobromae* e a maior foi de 79,67% para *Colletotrichum* sp.. Além disso, uma interação entre *Streptomyces* sp. e o fungo *Sphaceloma* sp. resultando na germinação de colônias satélite da bactéria foi reportada pela primeira vez.

No ensaio de antagonismo do filtrado de cultivo por difusão em poço de ágar, a cepa MG04 novamente foi incapaz de inibir *S. sclerotium*, mas demonstrou capacidade de inibir *C. paradoxa*. A porcentagem de inibição foi no geral menor, variando de 10,53% (*A. alternata*) até 49,17% (*Colletotrichum* sp.).

No antagonismo por compostos orgânicos voláteis não foi obtida inibição para *C. paradoxa*, *S. sclerotium* e *Sphaceloma* sp. O maior percentual de inibição dentre todos os testes foi obtido para *Bipolaris* sp. (86,68%). Além disso, resultados variaram de 19,70% (*R. microsporus*) a 57,08% (*L. pseudotheobromae*).

Cinco fontes de carbono e cinco fontes de nitrogênio do cultivo líquido foram testadas em função do potencial antifúngico e foi observado os melhores resultados para trealose (27% em *Colletotrichum* e 16,8% em *A. alternata*) e extrato de levedura (34,87% em *Colletotrichum* e 27,9% em *A. alternata*).

Por fim, as condições de cultivo foram variadas e foi definido que a temperatura de cultivo e concentração de extrato de levedura são os fatores de maior impacto no potencial antifúngico contra *Colletotrichum* sp., exercendo efeito negativo de -25,46 e -11,74, respectivamente. Para *A. alternata* não foi possível obter os resultados para o potencial antifúngico devido a uma contaminação na placa mãe.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A alta porcentagem de inibição antifúngica observada nos testes de cultura-dupla indica que a cepa MG04 de *Streptomyces* sp. apresenta alto potencial como componente ativo de produtos para biocontrole de fungos fitopatogênicos. Portanto, se torna interessante a investigação da cepa contra outros fitopatógenos, a investigação à fundo de seu potencial antimicrobiano comparativo e o desenvolvido de formulações para a aplicação da mesma no biocontrole.

Da mesma forma, se torna também interessante a caracterização dos compostos metabólicos produzidos pela cepa, tanto para a melhor compreensão dos resultados observados, quanto para o isolamento de novos compostos de interesse. Para tanto, seria possível empregar técnicas genômicas, como por exemplo o sequenciamento e avaliação dos *clusters* biossintéticos ou até mesmo técnicas cromatográficas para determinação das moléculas produzidas.

Além disso, a porcentagem de inibição atipicamente alta observada no ensaio de antagonismo de compostos orgânicos voláteis contra o fungo *Bipolaris* sp. indica o alto potencial para o isolamento de moléculas de interesse e desenvolvimento de produtos biofumegantes para o controle biológico.

Por fim, metodologias de teste mais rigorosas devem ser implementadas para investigação mais à fundo das vias biossintéticas de produção de compostos antimicrobianos e os parâmetros de cultivo associadas à mesma, no intuito de otimizar as condições de cultivo e, possivelmente, ampliação para produção em escala industrial

REFERÊNCIAS

- AFUTU, Emmanuel et al. Cowpea scab disease (*Sphaceloma* sp.) in Uganda. **Crop Protection**, v. 92, p. 213-220, 2017.
- AGRIOS, G. N. Plant pathology 5th edition: Elsevier academic press. **Burlington, Ma. USA**, p. 79-103, 2005.
- ALVAREZ, Elizabeth; MEJIA, Juan Fernando; VALLE, Teresa L. Molecular and pathogenicity characterization of *Sphaceloma manihoticola* isolates from south-central Brazil. **Plant Disease**, v. 87, n. 11, p. 1322-1328, 2003.
- ANITHA, A.; RABEETH, M. Control of *Fusarium* wilt of tomato by bioformulation of *Streptomyces griseus* in green house condition. **Afr J Basic Appl Sci**, v. 1, p. 9-14, 2009.
- ARMIN, Reyhaneh et al. Evaluation of apple root-associated endophytic *Streptomyces pulveraceus* strain ES16 by an OSMAC-assisted metabolomics approach. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 643225, 2021.
- ARORA, K. D. Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications (Mycology). 2005.
- AZEVEDO, João Lúcio et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.
- BARBIERI, M. C. G. et al. First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677-1677, 2017.
- BASILIO, A. et al. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. **Journal of applied microbiology**, v. 95, n. 4, p. 814-823, 2003.
- BÉRDY, János. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.
- BHATTI, Asma Absar; HAQ, Shamsul; BHAT, Rouf Ahmad. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 458-467, 2017.
- BIBI, Fehmida et al. Microbial Flora associated with the halophyte–*Salsola imbricate* and its biotechnical potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 65, 2018.
- BINDRABAN, Prem S. et al. Unlocking the multiple public good services from balanced fertilizers. **Food Security**, v. 10, p. 273-285, 2018.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- CARPENTER, P. C. et al. **Volatile organic compounds in the atmosphere**. Oxford, Blackwell, 2007.
- CHALLIS, Gregory L.; HOPWOOD, David A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. suppl_2, p. 14555-14561, 2003.
- CHEN, Jing et al. Response Surface Methodology (RSM) Mediated Optimization of Medium Components for Mycelial Growth and Metabolites Production of *Streptomyces alfalfae* XN-04. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1854, 2022.
- CHOYAM, Shilja et al. Assessing the antimicrobial activities of Ocins. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1034, 2015.
- CIMMINO, Alessio et al. Phytotoxic lipophilic metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia* species in Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 6, p. 1102-1107, 2017.
- COLLINGE, David B. et al. Biological control of plant diseases—What has been achieved and what is the direction?. **Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 1024-1047, 2022.
- COLOMBO, Elena Maria et al. Evaluation of in-vitro methods to select effective *streptomyces* against toxigenic fusaria. **PeerJ**, v. 7, p. e6905, 2019.
- COUTINHO, I. B. L. et al. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v. 66, n. 1, p. 90-104, 2017.
- CUZZUOL, Geraldo Rogerio Faustini; CAMPOS, Andrea. Aspectos nutricionais na vegetação de manguezal do estuário do Rio Mucuri, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, p. 227-234, 2001.
- DE PAULA, Ailton Ferreira et al. Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. **Frontiers in**

plant science, v. 13, p. 884716, 2022.

DEVILLERS, J.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F. The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. **Chemosphere**, v. 19, n. 10-11, p. 1693-1700, 1989.

DOS SANTOS, Ana Lucia Gomes; DE LIMA, Nádia Gilma Beserra. BIOGEOGRAFIA DOS MANGUEZAIS: OCORRÊNCIA, ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES 2021.

DOW, Lachlan et al. *Streptomyces* and their specialised metabolites for phytopathogen control—comparative in vitro and in planta metabolic approaches. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1151912, 2023.

DOWLING, Madeline et al. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. **Plant Disease**, v. 104, n. 9, p. 2301-2316, 2020.

EBRAHIMI-ZARANDI, Marzieh; SABERI RISEH, Roohallah; TARKKA, Mika T. Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1739, 2022.

EL HUSSEIN, Adil A. et al. Isolation and identification of *Streptomyces rochei* strain active against Phytopathogenic Fungi. **Br. Microbiol. Res. J.**, v. 4, n. 10, p. 1057-1068, 2014.

ELSON, M. K.; SCHISLER, D. A.; BOTHAST, R. J. Selection of microorganisms for biological control of silver scurf (*Helminthosporium solani*) of potato tubers. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 647-652, 1997.

EZZIYYANI, M. et al. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 6, p. 342-349, 2007.

FELBER, Aretusa Cristina et al. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 765-775, 2016.

GADKARI, DILIP; MÖRSDORF, G.; MEYER, ORTWIN. Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: identification of an unusual N₂-fixing system. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 21, p. 6840-6843, 1992.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Raquel et al. Proteomics of plant pathogenic fungi. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

GRAMMER, A. Antibiotic sensitivity and assay test. **Microbiological methods**, v. 235, 1976.

HAGGAG, W. M.; ABDALL, A. M. Foliar application of *Streptomyces aureofaciens* improve protection in Mango against postharvest anthracnose and enhances fruit yield. **Eur. J. Sci. Res.**, v. 63, p. 139-149, 2011.

HAMED, Javad; MOHAMMADIPANAH, Fatemeh. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 157-171, 2015.

HAMED, Javad; POORINMOHAMMAD, Naghme; WINK, Joachim. The role of actinobacteria in biotechnology. **Biology and biotechnology of actinobacteria**, p. 269-328, 2017.

HARDOIM, Pablo R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HASANI, Amin; KARIMINIK, Ashraf; ISSAZADEH, Khosrow. *Streptomyces*: characteristics and their antimicrobial activities. 2014.

HASEGAWA, Sachiko et al. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologica**, v. 20, n. 2, p. 72-81, 2006.

HAZARIKA, Shabiha Nudrat; THAKUR, Debajit. Actinobacteria. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 443-476.

HOSKISSON, Paul A.; SEIPKE, Ryan F. Cryptic or silent? The known unknowns, unknown knowns, and unknown unknowns of secondary metabolism. **MBio**, v. 11, n. 5, p. 10.1128/mbio.02642-20, 2020.

HOUNSA, Charlemagne-Gilles et al. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 671-680, 1998.

HSU, Shih. IAA production by *Streptomyces scabies* and its role in plant microbe interaction. 2010.

HU, Jie-Bi; CHEN, Yu-Chie; URBAN, Pawel L. On-target labeling of intracellular metabolites combined with chemical mapping of individual hyphae revealing cytoplasmic relocation of

- isotopologues. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 11, p. 5110-5116, 2012.
- INBAR, Ehud et al. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *streptomycetes*. **Microbial ecology**, v. 50, p. 73-81, 2005.
- INMETRO. **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. Revisão 09, DOQ-CGCRE-008, pág. 1-30. Junho de 2020.
- JOG, R.; NARESHKUMAR, G.; RAJKUMAR, S. Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. **Plant growth promoting actinobacteria: a new avenue for enhancing the productivity and soil fertility of grain legumes**, p. 33-45, 2016.
- JOO, Hwang-Soo; DEYRUP, Stephen T.; SHIM, Sang Hee. Endophyte-produced antimicrobials: a review of potential lead compounds with a focus on quorum-sensing disruptors. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, p. 543-568, 2021.
- KHAMNA, Sutthinan; YOKOTA, Akira; LUMYONG, Saisamorn. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 649-655, 2009.
- KHAN, M. Nasir; MOHAMMAD, Firoz. Eutrophication: challenges and solutions. **Eutrophication: Causes, Consequences and Control: Volume 2**, p. 1-15, 2014.
- KHARAT, Kiran R.; KHARAT, Amol; HARDIKAR, B. P. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Streptomyces* sp. from Lonar Lake. **African journal of biotechnology**, v. 8, n. 23, 2009.
- KHARE, Ekta; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2732, 2018.
- KIESER, T. et al. Growth and preservation of *Streptomyces*. **Practical Streptomyces Genetics**, p. 43-61, 2000.
- KIM, Ki-Hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the total environment**, v. 575, p. 525-535, 2017.
- KORPI, Anne; JÄRNBERG, Jill; PASANEN, Anna-Liisa. Microbial volatile organic compounds. **Critical reviews in toxicology**, v. 39, n. 2, p. 139-193, 2009.
- KRESPACH, Mario KC et al. *Streptomyces* polyketides mediate bacteria–fungi interactions across soil environments. **Nature Microbiology**, p. 1-14, 2023.
- KRYSENKO, Sergii. Impact of Nitrogen-Containing Compounds on Secondary Metabolism in *Streptomyces* spp.—A Source of Metabolic Engineering Strategies. **SynBio**, v. 1, n. 3, p. 204-225, 2023.
- KURATA, Hiroshi; KURIBAYASHI, Kazue. Soy Bean scab caused by *Sphaceloma glycines* sp. nov. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 18, n. 3-4, p. 119-121, 1954.
- LACAVA, Paulo Teixeira; MACHADO, Paula Cristiane; DE ANDRADE, Paulo Henrique Marques. Phosphate solubilization by endophytes from the tropical plants. **Endophytes: Mineral Nutrient Management, Volume 3**, p. 207-226, 2021.
- LE, Khanh Duy et al. *Streptomyces* sp. AN090126 as a biocontrol agent against bacterial and fungal plant diseases. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 791, 2022.
- LEBEN, Curt; KEITT, G. W. Antibiotics and plant disease, effects of antibiotics in control of plant diseases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 234-239, 1954.
- LI, Chao et al. Determining the significance of flotation variables on froth rheology using a central composite rotatable design. **Powder Technology**, v. 287, p. 216-225, 2016.
- LIU, Huamei et al. Insecticidal action of Quinomycin A from *Streptomyces* sp. KN-0647, isolated from a forest soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2243-2248, 2008.
- LIU, Shuai et al. Inducing new secondary metabolites through co-cultivation of the fungus *Pestalotiopsis* sp. with the bacterium *Bacillus subtilis*. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 3, p. 257-261, 2017.
- MACHADO, Alexandre R. et al. New occurrences of *Botryosphaeriaceae* causing black root rot of cassava in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 464-470, 2014.
- MAGALHÃES, Dilze Maria Argôlo et al. A new method for early detection of *Ceratocystis* spp. on various hosts. **Agrotrópica, Ilhéus**, v. 27, p. 209-214, 2015.
- MAHANTY, Trishna et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 3315-3335, 2017.
- MANAMGODA, D. S. et al. The genus *bipolaris*. **Studies in mycology**, v. 79, n. 1, p. 221-288, 2014.
- MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in mycology**, v. 86, p.

99-216, 2017.

MARIN-FELIX, Yasmina et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. **Studies in mycology**, v. 94, p. 1-124, 2019.

MATSUMOTO, Atsuko; TAKAHASHI, Yōko. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. **The journal of antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 514-519, 2017.

MBENOUN, Michael et al. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 757-784, 2014.

MEGURO, Akane et al. Induction of disease resistance in tissue-cultured seedlings of mountain laurel after treatment with *Streptomyces padanus* AOK-30. **Actinomycetologica**, v. 18, n. 2, p. 48-53, 2004.

MELOVIĆ, Boban et al. Attracting green consumers as a basis for creating sustainable marketing strategy on the organic market—relevance for sustainable agriculture business development. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1552, 2020.

MITROVIĆ, Ivana Ž. et al. Effect of agitation rate on the production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus* in a lab-scale bioreactor. **Acta Periodica Technologica**, n. 48, p. 231-244, 2017.

MOLOTOKS, Amy; SMITH, Pete; DAWSON, Terence P. Impacts of land use, population, and climate change on global food security. **Food and Energy Security**, v. 10, n. 1, p. e261, 2021.

MORATH, Shannon U.; HUNG, Richard; BENNETT, Joan W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal biology reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 73-83, 2012.

MOREIRA, Jean Vinícius; SILVA, Seforah Carolina Marques; CREMASCO, Marco Aurélio. Evaluation of carbon: nitrogen ratio in semi-defined culture medium to tacrolimus biosynthesis by *Streptomyces tsukubaensis* and the effect on bacterial growth. **Biotechnology reports**, v. 26, p. e00440, 2020.

MUS, Florence et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, 2016.

NEGA, Alemu. Review on concepts in biological control of plant pathogens. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 27, p. 33-54, 2014.

NEU, Júlia Paula et al. Aplicação de desenho experimental estatístico para otimização de método para determinação de ditiocarbamato em erva-mate (*Ilex paraguariensis*). 2022.

PALANIYANDI, Sasikumar Arunachalam et al. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 9621-9636, 2013.

PAN, Rui et al. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 294, 2019.

PANDEY, Anurag; SHUKLA, ANUPAM; MAJUMDAR, S. K. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 9, 2005.

PARTIDA-MARTINEZ, Laila P.; HERTWECK, Christian. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, n. 7060, p. 884-888, 2005.

PASSARI, Ajit Kumar et al. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11809, 2017.

PAYNE, David J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 29-40, 2007.

PETRINI, Orlando. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. New York, NY: Springer New York, 1991. p. 179-197.

PINTO, L. S. et al. Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 177-184, 2004.

PLACKETT, Robin L.; BURMAN, J. Peter. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

PROCÓPIO, Rudi Emerson de Lima et al. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 466-471, 2012.

QUINN, Gerry A. et al. *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal of medical microbiology**, v. 69, n. 8, p. 1040, 2020.

- QUIROGA, Emma Nelly; SAMPIETRO, Antonio Rodolfo; VATTUONE, Marta Amelia. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 89-96, 2001.
- RAAIJMAKERS, Jos M. et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037-1062, 2010.
- RAJAMANIKYAM, Maheshwari et al. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017.
- RAMIREZ-RODRIGUEZ, Laura et al. Optimization of the cytotoxic activity of three *Streptomyces* strains isolated from guaviare river sediments (Colombia, South America). **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- RASHAD, Ferial M. et al. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. **Microbiological research**, v. 175, p. 34-47, 2015.
- ROMANO, Stefano et al. Extending the “one strain many compounds”(OSMAC) principle to marine microorganisms. **Marine drugs**, v. 16, n. 7, p. 244, 2018.
- RUIZ, Beatriz et al. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical reviews in microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.
- SADEER, Nabeelah Bibi; ZENGİN, Gokhan; MAHOMOODALLY, Mohamad Fawzi. Biotechnological applications of mangrove plants and their isolated compounds in medicine-a mechanistic overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 393-414, 2023.
- SAMAC, Deborah A. et al. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. **Applied soil ecology**, v. 22, n. 1, p. 55-66, 2003.
- SÁNCHEZ-SUÁREZ, Jeysson et al. *Streptomyces*-derived metabolites with potential photoprotective properties—A systematic literature review and meta-analysis on the reported chemodiversity. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3221, 2020.
- SANTOS, Yara Dias dos. Estudo das comunidades bacterianas associadas às espécies vegetais do manguezal do Rio Pacoti-CE. 2017.
- SEGARAN, Gayathri et al. A review on endophytic actinomycetes and their applications. **J Chem Pharm Res**, v. 9, n. 10, p. 152-158, 2017.
- SEGARAN, Gayathri; SATHIAVELU, Mythili. Fungicidal and plant growth-promoting traits of *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, an endophyte from *Andrographis paniculata*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1125630, 2023.
- SENTHILKUMAR, N. Amaresan M.; SANKARANARAYANAN, A.; SENHILKUMAR. **Plant-microbe interactions**. Springer US, 2021.
- SHEPHERD, Micah D. et al. Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. **Current protocols in microbiology**, v. 18, n. 1, p. 10E. 1.1-10E. 1.8, 2010.
- SHIMIZU, Masafumi. Endophytic actinomycetes: biocontrol agents and growth promoters. **Bacteria in agrobiology: Plant growth responses**, p. 201-220, 2011.
- SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, Tulasi. Actinobacteria in agricultural and environmental sustainability. **Agro-Environmental Sustainability: Volume 1: Managing Crop Health**, p. 173-218, 2017.
- SHRIVASTAVA, Pooja; KUMAR, Rajesh. Actinobacteria: Eco-friendly candidates for control of plant diseases in a sustainable manner. In: **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2018. p. 79-91.
- SHUPING, D. S. S.; ELOFF, Jacobus Nicolaas. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 4, p. 120-127, 2017.
- SILLJÉ, H. H. W. et al. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 396-400, 1999.
- SILVA, Jicelene Elissa da. Aplicação de Arranjos Plackett-Burman na modelagem de Séries Temporais Lineares. 2013.
- SINGH, V. et al. Alternaria diseases of vegetable crops and its management control to reduce the low production. **International Journal of Agriculture Sciences, ISSN**, p. 0975-3710, 2015.
- SINGH, Vineeta et al. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2087, 2017.

- SINGH, Yengkhom Disco; SINGH, Mayanglambam Chandrakumar; PANDA, Manasa Kumar. Biotechnological aspects of mangrove microorganisms. In: **Biotechnological Utilization of Mangrove Resources**. Academic Press, 2020. p. 381-398.
- SOMERVILLE, Greg A.; PROCTOR, Richard A. Cultivation conditions and the diffusion of oxygen into culture media: the rationale for the flask-to-medium ratio in microbiology. **BMC microbiology**, v. 13, p. 1-2, 2013.
- SRIVASTAV, Arun Lal. Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. In: **Agrochemicals detection, treatment and remediation**. Butterworth-Heinemann, 2020. p. 143-159.
- STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- SUNDARAMURTHY, Suresh. Mixing in Shake Flask Bioreactor. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology; Flickinger, MC, Ed**, p. 1-17, 2016.
- THAKUR, D. et al. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 19, n. 3, p. 161-167, 2009.
- THATOI, Hrudayanath et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1-19, 2013.
- TRIPATHI, Pramila; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest biology and Technology**, v. 32, n. 3, p. 235-245, 2004.
- TUDI, Muyesaier et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.
- UMEZAWA, Hamao et al. A new antibiotic, kasugamycin. **The Journal of Antibiotics, Series A**, v. 18, n. 2, p. 101-103, 1965.
- VAN DER MEIJ, Anne et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 392-416, 2017.
- VERMA, Maya; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. Plant growth-promoting rhizobacteria: diversity and applications. **Environmental biotechnology: for sustainable future**, p. 129-173, 2019.
- VOELKER, François; ALTABA, Stéphane. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*'. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2447-2459, 2001.
- WAKSMAN, Selman A.; SCHATZ, Albert; REYNOLDS, Donald M. Production of antibiotic substances by actinomycetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, n. 1, p. 112, 2010.
- WHITE, James F. et al. Endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest management science**, v. 75, n. 10, p. 2558-2565, 2019.
- WILLIAMS, R. J.; MCDONALD, D. Grain molds in the tropics: problems and importance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, n. 1, p. 153-178, 1983.
- YI, Jeong Sang et al. Whole-genome sequencing and analysis of *Streptomyces* strains producing multiple antinematode drugs. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 1-18, 2022.
- ZHANG, Heng; LI, Yuanyuan; ZHU, Jian-Kang. Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture. **Nature plants**, v. 4, n. 12, p. 989-996, 2018.
- ZHAO, Xixi et al. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 922450, 2022.
- ZIN, N. Z. et al. Characterization and antimicrobial activities of two *Streptomyces* isolates from soil in the periphery of Universiti Putra Malaysia. **Trop Biomed**, v. 28, p. 651-660, 2011.