

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE LIMA DE MATOS

EFEITO ANTAGONISTA *IN VITRO* DE *Bacillus spp.* NO CRESCIMENTO DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

CURITIBA

2023

CAROLINE LIMA DE MATOS

EFEITO ANTAGONISTA *IN VITRO* DE *Bacillus spp.* NO CRESCIMENTO DE
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Artigo apresentado ao curso de Pós-Graduação Lato Sensu em Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Fitossanidade.

Orientadora: Ms. Isabelle Cristine Pansolin de Camargo

CURITIBA

2023

EFEITO ANTAGONISTA *IN VITRO* DE *Bacillus spp.* NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Caroline Lima de Matos

RESUMO

A agricultura global está avançando progressivamente para uma agricultura sustentável e regenerativa e atualmente o controle de doenças de plantas em sua maioria é realizado por fungicidas sintéticos. Nesse contexto, surge a demanda do mercado por alternativas mais seguras, de modo que os produtos microbiológicos ganham espaço. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antagonista *in vitro* de cinco diferentes gêneros de *Bacillus* (*amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis*, *tequilensis* e *velezensis*) contra quatro isolados fitopatogênicos de importante risco fitossanitário no Brasil, sendo eles, *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A atividade antagonista foi avaliada pelo método de cultura pareada, onde cada fitopatógeno foi conduzido em um ensaio independente, com delineamento inteiramente casualizado em três repetições. As avaliações foram realizadas medindo o diâmetro do crescimento micelial e a porcentagem de inibição (I%), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. O crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, foi inibido significativamente por todos os tratamentos de *Bacillus*, indicando um potencial de agentes biocontroladores, se destacando o isolado de *Bacillus tequilensis* – 41.

Palavras-chave: 1. *Bacillus* 2. Fungos fitopatogênicos 3. Antagonismo 4. Controle biológico

ABSTRACT

Global agriculture is moving towards sustainable and regenerative agriculture, nowadays the control of plant diseases is mostly carried out by synthetic fungicides. In this context, there is a demand in the market for safer alternatives and microbiological products gain space. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* antagonist activity of five different *Bacillus* genera (*amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis*, *tequilensis* and *velezensis*) against four phytopathogenic isolates of important phytosanitary risk in Brazil, namely *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Antagonist activity was evaluated by the paired culture method, where each phytopathogen was an independent assay in a completely randomized design with three replications. Estimates were performed by measuring the diameter of the mycelial growth and the percentage of continuity (I%), the data were displayed to the analysis of variance and the averages detected by the Tukey test, at 5% probability. The mycelial growth of *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* was significantly

inhibited by all *Bacillus* treatments, indicating a potential for biocontrol agents, especially the *Bacillus tequilensis* isolate – 41.

Keywords: 1. *Bacillus* 2. Phytopathogenic fungi 3. Antagonism 4. Biological control

1 INTRODUÇÃO

A produtividade de alimentos pode ser afetada por bactérias, fungos e vírus fitopatogênicos, provocando perdas significativas (WU et al., 2015). O uso de bactérias são uma alternativa sustentável para a redução de aplicação de insumos químicos, contribuindo para uma agricultura mais sustentável (OLIVEIRA et al. 2003). O controle microbiológico e o uso de microrganismos promotores de crescimento de plantas se tornarão uma demanda significativa da agricultura nos próximos anos (FIRA et al., 2018).

As espécies do gênero *Bacillus* fazem parte do grupo de bactérias chamadas de promotoras de crescimento de plantas (BPCVs) e vem sendo cada vez mais exploradas como defensivos agrícolas ou biofertilizantes (PEREZ-GARCÍA et al., 2011). O solo oferece um ambiente diversificado que abriga bilhões de microrganismos, muitos dos quais estabelecem interações complexas com as plantas, abrangendo um amplo espectro de resultados ecológicos, desde benefícios até patogenicidade (BARDGETT et al. 2014). O gênero *Bacillus* spp. em especial se destaca pela capacidade de formar endósporos e sua ampla capacidade de formar diferentes mecanismos antagônicos, garantindo uma longa sobrevivência no solo até que encontre as condições ideais para seu desenvolvimento e seus compostos são excelentes para combater fitopatógenos (FILHO et al. 2010).

Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antagonista *in vitro* de cinco diferentes gêneros de *Bacillus* (*amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis*, *tequilensis* e *velezensis*) contra quatro isolados fitopatogênicos de importante risco fitossanitário no Brasil, sendo eles, *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

2 METODOLOGIA

2.1 ORIGEM DOS ISOLADOS DE *Bacillus*

Foram utilizados seis isolados de *Bacillus* spp. pertencentes a Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Biotrop. Esses isolados foram identificados pela técnica de sequenciamento do rRNA 16s, sendo das espécies *Bacillus amyloliquefaciens* (isolado 194), *B. licheniformis* (isolado 162), *B. subtilis* (isolados 04 e 360), *B. tequilensis* (isolado 41) e *B. velezensis* (isolado 160), todos os isolados foram obtidos de solo coletado em área de Mata atlântica no Paraná. Os isolados foram mantidos em meio líquido nutriente.

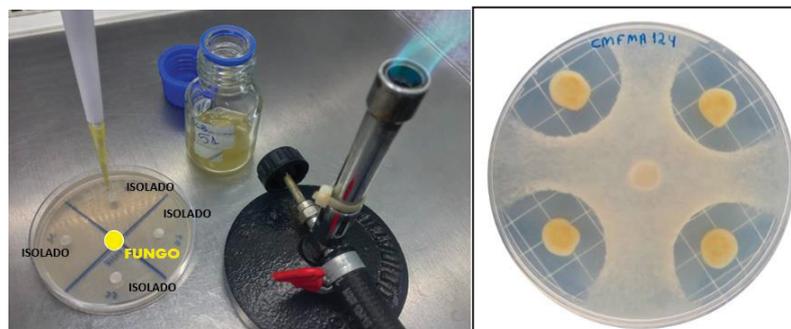
2.2. ORIGEM DOS FITOPATÓGENOS

Quatro fitopatógenos pertencentes a Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos da Biotrop foram utilizados no estudo, sendo eles: *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, os fitopatógenos foram mantidos em meio de cultura ágar batata dextrose - BDA.

2.3 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO EM CULTURA PAREADA

O antagonismo dos *Bacillus* sobre os diferentes patógenos foi avaliado pela técnica de cultura pareada, na qual um disco de 8 mm contendo o fitopatógeno foi colocado no centro da placa de petri (84 x 15 mm) em meio BDA e em 4 pontos equidistantes radialmente a 2,5 cm do disco foi inoculado em um disco de 6 mm de papel de germinação 10µL do cultivo líquido em meio nutriente de cada isolado de *Bacillus* (FIGURA 1).

FIGURA 1 - ENSAIO DE ANTAGONISMO PELA TÉCNICA DE CULTURA PAREADA



FONTE: O autor (2023).

Foram conduzidos quatro ensaios de forma independente para cada um dos fitopatógenos sob delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos (TABELA 1) e três repetições.

TABELA 1 – Descrição dos tratamentos

Tratamento	Descrição
1	Testemunha
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - isolado 194
3	<i>Bacillus licheniformis</i> - isolado 162
4	<i>Bacillus subtilis</i> - isolado 04
5	<i>Bacillus subtilis</i> - isolado 360
6	<i>Bacillus tequilensis</i> - isolado 41
7	<i>Bacillus velezensis</i> - isolado 160

FONTE: O autor (2023).

As avaliações do diâmetro do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio se apresentava colonizada pelo fitopatógeno no tratamento testemunha e a percentagem de inibição (% I) dos fitopatógenos calculada conforme Menten et al., 1976, utilizando a fórmula:

$$I (\%) = \frac{(\text{diâmetro médio do crescimento micelial da testemunha} - \text{diâmetro médio do crescimento micelial do tratamento})}{\text{diâmetro médio do crescimento micelial da testemunha}} \times 100$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância com o auxílio do software R.

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

De modo geral constatou-se que todos os tratamentos que utilizaram *Bacillus* apresentam algum efeito antagônico sobre os fitopatógenos (TABELA 2). As pesquisas para avaliar a capacidade antagônica do gênero *Bacillus* está em crescente crescimento, como a de Zambrano et. al. (2022) que relaram o efeito antagônico de *Bacillus sp.* contra o patógeno *Sclerotium sp.* e Pershakova et al. (2018) que avaliaram com sucesso o efeito antagônico de *Bacillus subtilis* contra os patógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria radicina* e *Erwinia carotovora*.

No ensaio de antagonismo com *Botrytis cinerea* observou-se inibição significativa quando confrontado com os todos os tratamentos de *Bacillus*, inibindo de 46 a 71% o crescimento do fitopatógeno.

Para a *Ceratocystis paradoxa*, somente o tratamento 6, *Bacillus tequilensis* – isolado 41 possui efeito antagonista, inibindo em 54% o crescimento do fitopatógeno.

Já para o *Fusarium solani* todos os tratamentos de *Bacillus* (T2 ao T7) possuem efeito antagônico com destaque para os tratamentos T3 - *Bacillus licheniformis* - isolado 162, T5 - *Bacillus subtilis* - isolado 360 e T6 - *Bacillus tequilensis* - isolado 41, inibindo em 34%, 35% e 35% o crescimento do fitopatógeno, respectivamente.

Para a *Sclerotinia sclerotiorum* os tratamentos T2 - *Bacillus amyloliquefaciens* - isolado 194, T3 - *Bacillus licheniformis* - isolado 162, T4 - *Bacillus subtilis* - isolado 04 e T6 - *Bacillus tequilensis* - isolado 41 possuem efeito antagonista, com destaque para os tratamentos T4 e T6 inibindo em 39% e 38% o crescimento do fitopatógeno, respectivamente.

Quando comparado todos isolados de *Bacillus* contra todos os fitopatógenos a ação antagônica do tratamento 6, *Bacillus tequilensis* – isolado 41 se destaca reduzindo o crescimento micelial com superioridade para todos os fitopatógenos testados, Ocegueda-Reyes et al., 2020 reforça a importância do uso do gênero *Bacillus* na agricultura tanto pelo seu potencial em inibir fitopatógenos quanto pela sua ação promotora de crescimento vegetal. A formulação de bioprodutos a base de bactérias pode contribuir na redução de doenças, minimizar os impactos ambientais e de maneira sustentável aumentar a produtividade e a segurança alimentar (MARIANO et al., 2013).

TABELA 2 – MÉDIA A AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DO CRESCIMENTO MICELIAL (D) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO (I) DE *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* POR DIFERENTES ISOLADOS DE *Bacillus*.

Tratamento	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Ceratocystis paradoxa</i>		<i>Fusarium solani</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %
1 - Testemunha	84 b	0	84 b	0	84 c	0	84 c	0
2 - <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - isolado 194	36 a	57	84 b	0	29 ab	65	47 b	44
3 - <i>Bacillus licheniformis</i> - isolado 162	27 a	68	84 b	0	34 b	60	50 b	40
4 - <i>Bacillus subtilis</i> - isolado 04	25 a	71	84 b	0	29 ab	65	39 a	54
5 - <i>Bacillus subtilis</i> - isolado 360	41 a	51	84 b	0	35 b	58	84 c	0
6 - <i>Bacillus tequilensis</i> - isolado 41	30 a	65	39 a	54	26 a	69	38 a	55
7 - <i>Bacillus velezensis</i> - isolado 160	45 a	46	84 b	0	35 b	58	84 c	0
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	15		3		4		2	

*MÉDIAS SEGUIDAS DA MESMA LETRA NA COLUNA, NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE SI, PELO TESTE DE TUKEY, A 5% DE SIGNIFICÂNCIA.

FONTE: O autor (2023)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. tequilensis* e *B. velezensis* observadas nesses ensaios inibem o crescimento micelial de *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*, com destaque para o *Bacillus tequilensis* – isolado 41.

Todos os isolados de *Bacillus* possuem potencial para utilização em produtos biológicos.

REFERÊNCIAS

BARDGETT, R. D., VAN DER PUTTEN, W. H. **Below ground biodiversity and ecosystem functioning**. Nature 515: 505–511, 2014.

FIRA, D., DIMKIĆ, I., BERIĆ, T., LOZO, J., & STANKOVIĆ, S. **Biological control of plant pathogens by Bacillus species**. Journal of Biotechnology, 285: 44-55. 2018.

FILHO R. L.; FERRO H. M.; PINHO R. S. N. **Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis***. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. - RJ. Seropédica. Embrapa Agrobiologia, 40p. 2003.

OCEGUEDA-REYES, M., CA SAS-SOLÍS, J., VIRGEN-CALLEROS, G., GONZALEZ-EGUIARTE, D., LÓPEZ-ALCOCER, E. & OLALDE-PORTUGAL, V. (2020). **Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagonicas a *Sclerotium cepivorum***. Revista Mexicana de Fitopatología, 38(1): 146-159.

MARIANO, R. L. R. et al. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 1, p. 89-111, 2013.

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. **Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophominia phaseolina* (Tass.) Goid. “in vitro”**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

PERSHAKOVA, T. V.; KUPIN, G. A.; MIHAYLYUTA, L. V.; BABAKINA, M. V.; PANASENKO, E. Y; VIKTOROVA E. P. **Investigation of antagonistic properties of bacteria *Bacillus subtilis* against carrot phytopathogenes in vitro and in vivo**

experiments. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v.10(6), p.1619-1622, 2018.

PÉREZ-GARCÍA A, ROMERO D, DE VICENTE A. **Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture.** *Curr Opin Biotechnol*, v. 22, p.187-193, 2011.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2021.

WU, L., WU, H-J., QIAO, J., GAO, X., & BORRISS, R. **Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of *Bacillus* Based Bioinoculants.** *Frontiers in Microbiology*, 6:1395, 2015.

ZAMBRANO, M. A. R., CASTANHARO, G. R. P., AGUIAR, R. W. S. A., ALOÍSIO, F. C. J. **In vitro antagonistic activity of *Sclerotium sp.* by *Bacillus sp.*** *Research, Society and Development*, v. 11, n.13, e380111335351, 2022.