



Efeito antagonista de *Bacillus velezensis* no controle biológico de fitopatógenos habitantes de solo
*Antagonistic effect of *Bacillus velezensis* on the biological control of soil-dwelling phytopathogens*

SCHUSTER-RUSSIANO, Maira Cristina¹; SALVADORI, Camila Natasha²; DOS SANTOS, Joeliton Campani³; DALPRAY, Andrey Luis⁴; MAZARO, Sérgio Miguel⁵.

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná, maira.schuster@outlook.com; ²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, camilasalvadori@alunos.utfpr.edu.br; ³Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campanijoeliton@gmail.com; ⁴Universidade Tecnológica Federal do Paraná, andreydalprai@alunos.utfpr.edu.br; ⁵Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sergio@utfpr.edu.br.

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de agroecossistemas

Resumo: Dentre os pilares da agroecologia, está o uso de ferramentas que reduzam a utilização de agrotóxicos no meio agrícola, com vistas a preservar a saúde humana e ambiental. Dessa forma, o uso de agentes antagonistas de controle biológico vem de encontro com esta perspectiva, sendo considerado uma solução ecológica e eficaz no controle de fitopatógenos de solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito de *Bacillus velezensis* no controle biológico de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium tucumaniae*. O experimento foi conduzido em placas de Petri®, realizando confronto direto entre antagonista e fitopatógenos, avaliando-se o crescimento micelial diariamente. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Pode-se observar que para todos os fitopatógenos estudados, houve redução no crescimento micelial, com ação de antibiose exercida pelo antagonista.

Palavras-chave: antibiose; biocontrole; microrganismos; orgânico.

Introdução

A agricultura orgânica é um sistema não convencional de cultivo, baseada em princípios agroecológicos, comprometido com a ética, saúde, cidadania e preservação dos recursos naturais. Visa a não utilização de agrotóxicos, e deste modo, abrange alguns movimentos, como a agricultura alternativa, biodiâmina, permacultura, agroflorestas e biológica (PENTEADO, 2001).

O uso do controle biológico se torna fundamental para o controle de pragas e doenças em um ambiente agroecológico, demonstrando ser uma ferramenta efetiva, visto que moléculas químicas contribuem com a contaminação do ecossistema e ocasionam prejuízos a saúde humana e animal, prejudicando microrganismos benéficos presentes no solo, como antagonistas e mineralizados de matéria orgânica, além de muitas moléculas químicas serem ineficientes no controle de fitopatógenos alvos, devido apresentarem resistência (SILVA, MELO, 1997; LUCAS, HAWKINS, FRAAIJE, 2014).



Dentre os principais fitopatógenos de solo, pode-se citar *Sclerotinia sclerotiorum*, a qual atinge mais de 400 espécies, dentre elas algodão, tomate, girassol, batata, canola, feijão e soja (ANDRADE et al. 2015; BOLTON, THOMMA, NELSON, 2006). *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão de carvão; *Rhizoctonia solani* causadora da rizoctoniose e tombamento de plântulas, e complexo *Fusarium* spp. que ocasiona a podridão vermelha da raiz, característica da coloração vermelha/arroxada dos órgãos afetados. Todos estes fitopatógenos são necrotróficos, ou seja, sobrevivem em restos culturais (MADALOSSO et al. 2022).

Um dos microrganismos com potencial para controle, e que está envolvido no controle biológico de doenças, são as bactérias do gênero *Bacillus*, sendo a mais utilizada e comercializada mundialmente. Se tratam de bactérias Gram-positivas e aeróbicas, de hábito cosmopolita, encontradas em todas as regiões do mundo, em diferentes substratos, como folhas, grãos, solo, insetos mortos e rizosfera (MONNERATT et al. 2020). Também é considerada uma importante rizobactéria promotora de crescimento em plantas (RPCP) (ANSARY et al. 2018).

Portanto, o objetivo deste trabalho, é avaliar o controle biológico de *Bacillus velezensis* sobre os fitopatógenos agrícolas *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *R. solani* e *F. crassiseptatum* *in vitro*.

Metodologia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico II, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

Em câmara de fluxo laminar, com placas de Petri® com 8,3 cm de diâmetro, contendo 15 mL de meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) solidificado, foi transferido utilizando alça de platina estéril, um disco de micélio de 7 mm de diâmetro do fitopatógeno do lado direito da placa, à 1cm de distância da borda.

Na mesma placa do lado esquerdo, à 1 cm de distância da borda, foi adicionado 5 µl de *Bacillus velezensis* diluído na concentração de 10⁹ células/g. Cada placa corresponde a uma unidade experimental.

As placas foram vedadas com plástico filme, e incubadas em BOD à 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Com auxílio de uma régua graduada avaliou-se a cada 24 horas o crescimento micelial dos patógenos, até cada testemunha atingir o crescimento completo na placa.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors; por se tratar de um experimento qualitativo x quantitativo, realizou-se a ANOVA (Scott knott à 5% de probabilidade) seguido da análise de regressão no software Rbio (BHERING, 2017).



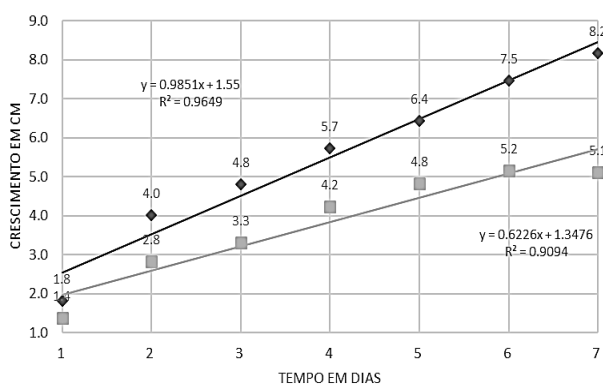
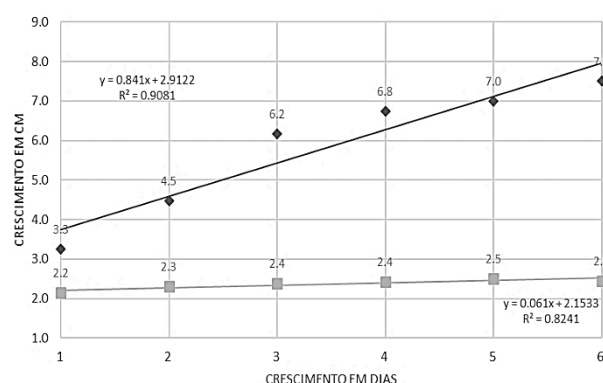
A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada com base na fórmula de Menten et al. (1976):

$$\text{Inibição (\%)} = \left[\frac{\phi \text{ da testemunha} - \phi \text{ do tratamento}}{\phi \text{ da testemunha}} \right] * 100$$

Os fitopatógenos *Fusarium tucumaniae* (CMES 25), *Macrophomina phaseolina* (CMES 1574), *Rhizoctonia solani* (CMES1861) e *Sclerotinia sclerotiorum* (CMES 2131) foram obtidos da “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais” da Embrapa Soja em Londrina, PR.

Resultados e Discussão

Pode-se perceber pela figura 1, que para todos os fitopatógenos estudados, houve redução do crescimento micelial quando em confronto com *B. velezensis*.



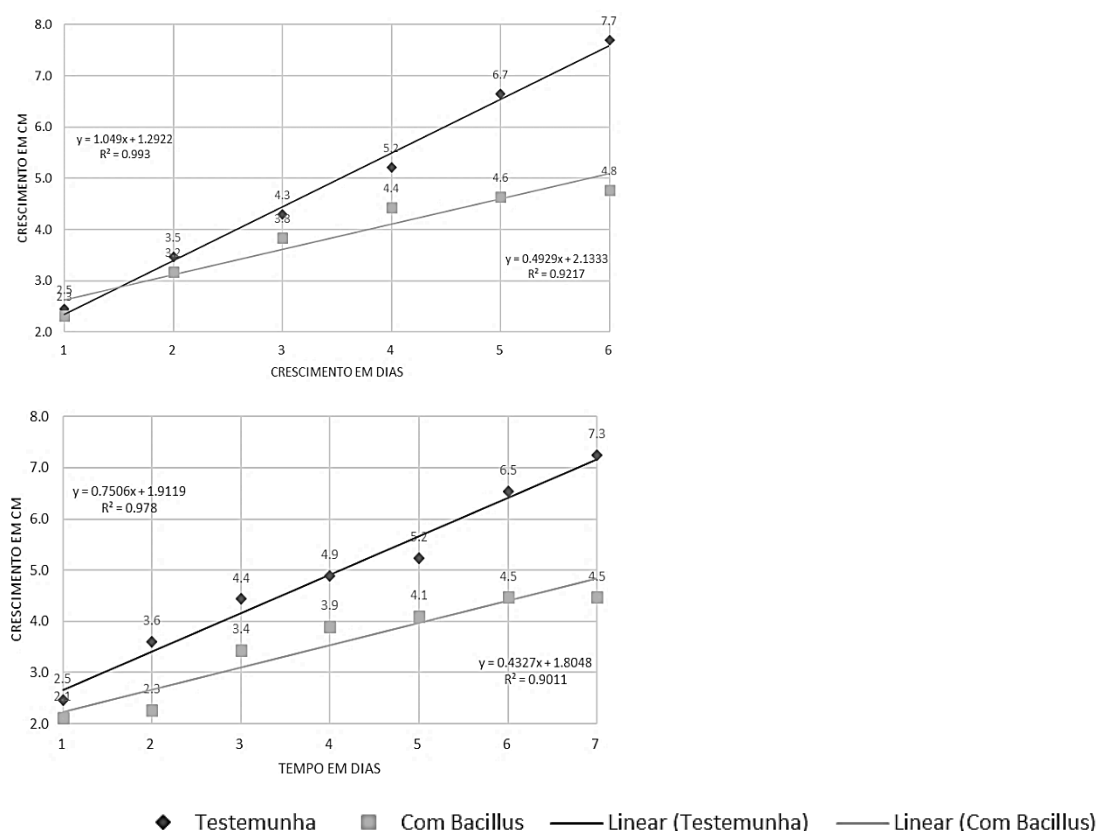


Figura 1. Potencial antagonista de *B. velezensis* sobre os fitopatógenos *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *F. tucumaniae* (respectivamente), expresso em crescimento micelial (cm) dos fitopatógenos ao longo do período de avaliação (dias). (CV = 7,51%, *R. solani*; 11,86%, *S. sclerotiorum*; 6,46%, *M. phaseolina*; e 11,42%, *F. tucumaniae*).

No tratamento contendo *B. velezensis*, houve uma redução de 66% no crescimento micelial de *R. solani* ao sexto dia de avaliação. O mesmo efeito foi percebido por Huang et al. (2017) ao estudarem o controle de *B. subtilis* sobre *R. solani* em pimenteiro, reduzindo 42,3% do crescimento micelial do fitopatógeno, além de aumentar em 14% o crescimento de mudas de pimenta. Pour et al. (2021) observaram este efeito ao utilizar *B. velezensis* encapsulado em alginato, no controle de *R. solani* em feijoeiro, resultando na redução da doença.

No último dia de avaliação houve redução de 37% no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, 37% no crescimento micelial de *M. phaseolina* e de 38,35% no crescimento micelial de *F. tucumaniae*, em relação com a testemunha.

Torres et al. (2016) relatam resultados semelhantes no controle utilizando cepas de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sobre *M. phaseolina*. Isolados endofíticos de *Bacillus* spp. também se mostraram eficientes contra *S. sclerotiorum* induzindo alterações morfológicas nas hifas e redução do peso seco do micélio (ANSARY et al. 2018). Xu et al. (2022) apontam o efeito antagônico de *B. amyloliquefaciens* sobre *F. oxysporum*, causador da murcha do tomateiro.



A figura 2 ilustra o mecanismo de ação de *Bacillus velezensis* sobre os quatro fitopatógenos, apresentando halo de inibição característico da antibiose exercida pela bactéria.

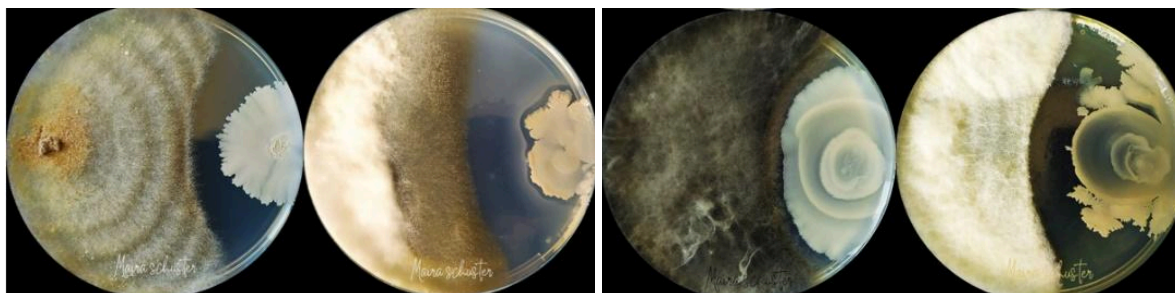


Figura 2. Halo de inibição entre antagonista e os fitopatógenos *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *F. tucumaniae*, respectivamente, caracterizado pela liberação de metabólitos no meio de cultivo (antibiose).

Os mecanismos de ação diretos observados pelos antagonistas dentro do controle biológico de doenças, são antibiose, competição por espaço e nutrientes e liberação de compostos orgânicos voláteis (LEELASUPHAKUL, 2008). Sendo a antibiose entendida como liberação de compostos difusíveis ou antibióticos por um microrganismo, capaz de inibir o crescimento de outro (BENITEZ, 2004).

Conclusões

Com o presente trabalho pode-se verificar o potencial antagonista de *B. velezensis* sobre *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *F. tucumaniae*, em experimento *in vitro*, destacando o controle por meio de antibiose do antagonista.

Agradecimentos

Agradecimento à CAPES e à UTFPR.

Referências bibliográficas

- ANDRADE, C.M., TINOCO, M.L.P., RIETH, A.F., MAIA, F.C.O., ARAGÃO, F.J.L. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. 24 August 2015. <https://doi.org/10.1111/ppa.12447>.
- ANSARY, W.R., PRINCE, F.R.K., HAQUE, E., SULTANA, F., WEST, H.M., RAHMAN, M., MONDOL, A.M., AKANDA, A.M., RAHMAN, M., CLARKE, M.L., ISLAM, T. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. **Z Naturforsch C J Biosci**. 2018 Apr 25;73(5-6):247-256. doi: 10.1515/znc-2018-0002. PMID: 29652669.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN. A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, 7(4): 249-260, 2004.
- BHERING, L.L. Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17: 187-190p, 2017.



- BOLTON, M.D., THOMMA, B.H.J., NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology** 7, 1–16. 2006.
- HUANG, Y., WU, Z., HE, Y., YE, B.C., LI, C. Rhizospheric *Bacillus subtilis* Exhibits Biocontrol Effect against *Rhizoctonia solani* in Pepper (*Capsicum annuum*). **Biomed Res Int.** 2017;2017:9397619. doi: 10.1155/2017/9397619. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29445747; PMCID: PMC5763166.
- LEELASUPHAKUL, W., HEMMANEE, P., & CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. Postharvest **Biology and Technology**, 48(1), 113-121, 2008.
- LUCAS, J.A., HAWKINS, N.J., FRAAIJE, B.A. The evolution of fungicide resistance. **Adv Appl Microbiol.** 2015;90:29-92. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.09.001
- MADALOSSO, M.G., BRAGA, L.E., STEINHAUS, E.A., WARPECHOWSKI, L.F. Manual de identificação de doenças da soja e erros de diagnose. 2 ed. Editora Metrics, Santo Angêlo - Brasil, 2022.
- MENTEN, J. O. M; MACHADO, C. C; MINUSSI, E; CASTRO, C; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- MONNERATT, R., MONTALVÃO, S.C.L., MARTINS, E.S., QUEIROZ, P.R.M., SILVA, E.Y.Y., GARCIA, A.R.M., CASTRO, M.T., ROCHA, G.T., FERREIRA, A.D.C.L., GOMES, A.C.M.M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF, 2020.
- PENTEADO, S.R. Agricultura orgânica. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, (Série Produtor Rural, Edição Especial), 2001. 41 p.
- POUR, M.M., SABERI-RISEH, R., ESMAEILZADEH-SALESTANI, K., MOHAMMADINEJAD, R., LOIT, E. Evaluation of *Bacillus velezensis* for Biological Control of *Rhizoctonia solani* in Bean by Alginate/Gelatin Encapsulation Supplemented with Nanoparticles. **J Microbiol Biotechnol.** 2021 Oct 28;31(10):1373-1382. doi: 10.4014/jmb.2105.05001. PMID: 34409947; PMCID: PMC9705934.
- SILVA, C.M.M.S., MELO, I. S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis in MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. de. **Microbiologia ambiental**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. 438 p.
- XU, X., WANG, Y., LEI, T., SOHAIL, M.A., WANG, J., WANG, H. Synergistic Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* SDTB009 and Difenconazole on Fusarium Wilt of Tomato. **Plant Dis.** 2022 Aug;106(8):2165-2171. doi: 10.1094/PDIS-12-21-2650-RE. Epub 2022 Jul 17. PMID: 35077231.