# Potencial de cepas de *Bacillus* spp. como agentes biológicos no controle de *Fusarium* sp. *in vitro* e em sementes de soja

BATTISTELLI, L. C.; ALVES, S. C.; MIRA, W. V. M.; SANTOS, C. R. A.

Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena - Departamento de Biotecnologia - Lorena/São Paulo.

**RESUMO**

A utilização de agentes biológicos para o controle de pragas e promoção de crescimento vegetal se mostra como uma alternativa sustentável e promissora, podendo substituir ou reduzir o uso de pesticidas e compostos agroquímicos. O uso de bactérias do gênero *Bacillus* como agentes biológicos para o controle de fungos já é catalogado na literatura e o presente estudo avaliou a capacidade de cepas de *Bacillus* em inibir, “in vitro” e em sementes de soja, o crescimento do fungo *Fusarium sp.*, que afeta principalmente a germinação de sementes. As cepas de *Bacillus* foram isoladas do solo e selecionadas com base na sua atividade inibitória frente ao crescimento do micélio fúngico. O teste direto de antagonismo mostrou que as cepas UFT-06, UFT-47B e UFT-38 apresentaram maiores atividades inibitórias, já o teste indireto mostrou melhor capacidade inibitória das cepas UFT-47B e UFT-38 a partir do oitavo dia de incubação. O teste enzimático, embora não significativo, mostrou que as cepas de *Bacillus* podem secretar enzimas hidrolíticas, facilitando a germinação. O teste de patologia mostrou que as cepas UFT-38 e UFT-47B em concentrações acima de 25% de cultivo bacteriano inibem a germinação de Fusarium em sementes de soja. As cepas de *Bacillus* UFT-38 e UFT-47B possuem potencial aplicação como agentes de biocontrole de *Fusarium sp.*, mostrando uma alternativa efetiva no controle de fitopatógenos.

1. **INTRODUÇÃO**

A crescente demanda por um fornecimento estável de alimentos requer um controle eficiente das principais pragas e doenças de plantas. A aplicação de pesticidas sintéticos ainda é uma das principais práticas de controle de pragas e fitopatógenos, embora seu uso em excesso esteja relacionado a diversos problemas ambientais e de saúde (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005; BACH et al., 2016). Como alternativa promissora ao uso de agroquímicos, microrganismos podem ser utilizados como agentes biológicos, podendo promover o crescimento vegetal, contribuindo com o aumento de produtividade, além de poderem atuar como antagonistas para o controle de pragas ou doenças causadas por fitopatógenos (FOYSAL; LISA, 2018; PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; DE VICENTE, 2011).

Fitopatógenos como os do gênero *Fusarium* possuem estruturas de resistência que garantem a sua sobrevivência no solo ou na radícula (embrião da semente), podendo causar diversas doenças em plantas, prejudicando o rendimento e a qualidade das culturas (GOULART, 2018). Dentre as doenças causadas por fungos do gênero *Fusarium* estão: podridão de raiz, “damping off”, murchas vasculares e deterioração de sementes, podendo afetar negativamente culturas de milho, trigo (KANT et al., 2011; MACHADO et al., 2013) e soja (PEDROZO; LITTLE, 2017). Algumas espécies do grupo *Fusarium* também são relatadas pela produção de micotoxinas (fumosina) em grãos armazenados, representando grande preocupação para o controle de qualidade do milho utilizado como alimento pelos seres humanos e animais (MACHADO et al., 2013). A diagnose preventiva, antes da semeadura, bem como o tratamento de sementes, são medidas que auxiliam no controle de doenças ocasionadas por *Fusarium* sp. (RAMOS, 2014). Com isso, a determinação de agentes biológicos adequados para o controle de *Fusarium* é objeto de vários estudos que avaliam a atividade antifúngica de espécies de *Bacillus* por diversos mecanismos (DOURIET-GÁMEZ et al., 2017; YUAN et al., 2012).

As espécies do gênero *Bacillus*, geralmente encontradas no solo, têm sido amplamente utilizadas como antagonistas de fungos e insetos e apresentam vantagens quando comparadas a outros microrganismos (PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; DE VICENTE, 2011). As características antagônicas atrativas para os estudos de controle biológico de doenças podem ocorrer através de diversos mecanismos como: parasitismo através da produção de enzimas líticas, antibiose, competição e resistência sistêmica induzida (BRAGA JUNIOR et al., 2017; EL-BENDARY; HAMED; MOHARAM, 2016). A capacidade das espécies de *Bacillus* spp. de formar endósporos e tolerar condições ambientais adversas podem permitir que o organismo cresça em todos os ambientes e produza metabólitos com efeitos antagônicos contra fitopatógenos de origem microbiana (AMIN; RAKHISI; AHMADY, 2015).

A classe mais importante de produtos microbianos comerciais para uso fitossanitário é formulada com espécies do gênero *Bacillus*, que são bastante explorados como pesticidas, fungicidas ou fertilizantes (PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; DE VICENTE, 2011). Os metabólitos antimicrobianos e antibióticos produzidos por cepas de *Bacillus* ssp. revelam sua grande utilidade para o desenvolvimento de produtos para o controle de fitopatógenos nas mais diversas culturas, resultando numa estratégia eficiente de biocontrole de pragas e fitopatógenos, além de promover um sistema sustentável de cultivo (RAHMAN et al., 2016). Diversas espécies de *Bacillus* spp tem sido descritas por promover benefícios às plantas e agir de forma antagônica contra doenças causadas por *Fusarium* spp. Culturas de milho (CAVAGLIERI et al., 2005), tomate (ROCHA et al., 2017) e soja (ZHANG; XUE; TAMBONG, 2009) estão entre as quais mais emprega-se *Bacillus* spp como agente de controle biológico de pragas.

Apesar dos diversos estudos sobre *Bacillus* como agente antagônico de fungos fitopatogênicos, poucos relatam a eficiência da sua utilização como inoculante em sementes de soja para controlar fungos do gênero *Fusarium*.Tendo em vista todas as propriedades de *Bacillus* spp., este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de *Fusarium* sp. em sementes de soja e verificar a atuação de diferentes cepas de *Bacillus* como potenciais agentes de inibição do crescimento de *Fusarium* *in vitro* e em sementes de soja.

1. **MATERIAIS E MÉTODOS**

**2.1 – Teste de germinação de sementes de Soja inoculadas com *Fusarium* sp.**

O fungo fitopatógeno utilizado neste trabalho foi o *Fusarium* sp., pertencente à coleção do Laboratório Manejo Integrado de Pragas (MIP) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO. A avaliação da ação patogênica do *Fusarium* sp. na germinação de sementes de soja foi realizada seguindo as Regras de Análise em Sementes disponibilizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, utilizando a técnica do papel-filtro (Germitest) umedecido. Placas perfuradas com 50 orifícios auxiliaram na distribuição das sementes. A suspensão fúngica. Para o preparo da mesma, o fungo foi cultivado em meio BDA por 7 dias. Foi realizada a raspagem dos micélios com o auxílio de uma alça e 15 mL de água destilada estéril por placa para então este líquido ser colocado em um borrifador. A suspensão foi borrifada nas sementes para inoculação do patógeno. O experimento foi realizado em quatro repetições, totalizando 200 sementes e o grupo controle foi composto por sementes de soja não inoculadas com fungo *Fusarium*.

**2.2 – Isolamento, seleção e caracterização de *Bacillus* spp.**

# O isolamento e a seleção das linhagens de *Bacillus* spp. foram realizados a partir de 30 amostras de solos escolhidas aleatoriamente, oriundas de cidades do sudeste do estado do Pará (5°26'21.3"S 49°09'44.2"W), Norte do estado do Tocantins (7°11'15.3"S 48°22'56.9"W) e Sul do estado do Maranhão (7°17'28.8"S 46°10'02.1"W), mesorregião do Bico do Papagaio (5°24'36.0"S 48°14'57.0"W).

De cada amostra de solo foram retiradas 6 gramas que foram homogeneizadas em 50 mL de solução salina (NaCl) 0,85%, agitadas em Agitador tipo Shaker a 200 rpm por 30 minutos e retirada a alíquota de 0,1 mL para as diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) acondicionadas em tubos de 1,5 mL. Realizou-se choque térmico a 80 ºC por 10 minutos das amostras que foram, posteriormente, acondicionadas em água gelada pelo mesmo período de 10 minutos.

0,1 mL de amostra foram pipetados separadamente em placas de Petri contendo meio sólido CCY (STEWART et al., 1981), espalhadas com alça de Drigalski, e incubadas por 14 horas a 29 ºC. Em seguida, foram selecionadas 64 colônias de cada solo. Foram selecionadas colônias que apresentavam coloração opaca, formato desuniforme e cores que tendem para o branco gelo. As colônias selecionadas foram repicadas em 4 placas de Petri com meio CCY com desenho de 16 triângulos isósceles. As placas foram acondicionadas em incubadora por 72 horas à 29ºC. As colônias foram coradas em lâminas com coloração de Gram, onde foram observados a morfologia das colônias, esporos, presença e formato de cristais bipiramidais (MADIGAN et al., 2010).

**2.3 – Seleção de bactérias com atividade antagônica**

Para a seleção de bactérias com atividade antagônica, foi utilizado o teste de disco-difusão em ágar seguindo o protocolo adaptado (BAUER et al., 1966). O teste avaliou de forma qualitativa a sensibilidade aos antimicrobianos distribuindo 13 discos de papel filtro em duas placas de Petri com meio BDA. Cada papel filtro foi impregnado com uma suspensão bacteriana contendo cepas unitárias de *Bacillus* ssp. e em cada placa foi inoculado o fungo *Fusarium* sp. no centro como mostra a figura S1. As placas foram incubadas em câmara por 7 dias à 30 ºC. O diâmetro do halo formado em torno do disco de papel contendo a cultura bacteriana indicou a ocorrência de atividade antagônica da bactéria avaliada contra o crescimento de *Fusarium* sp.

**2.4 – Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* sp. em cultura pareada**

**2.4.1 –Antagonismo pelo método direto**

O isolado fúngico foi cultivado em meio BDA e incubado à 25 ºC por 7 dias. As cepas bacterianas foram previamente cultivadas em meio HIMEDIA® Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth) com adição de ágar, por 24 horas a 30 ºC.

O teste de antagonismo foi realizado pelo método de cultura pareada, com o confronto direto dos antagonistas (*Bacillus*) com o fitopatógeno (*Fusarium* sp.). Cada linhagem bacteriana selecionada pelo teste de disso-difusão em ágar (item 2.3) foi inoculada em BDA em duas linhas paralelas com espaço de 2 cm cada. O fungo foi inoculado no centro da placa entre as linhas de bactéria, e foram incubados a 30 ºC por 7 dias. Cada cultivo pareado foi realizado em quatro repetições.

Após a incubação, o crescimento micelial do fungo foi medido e comparado ao crescimento do fungo cultivado na ausência de bactéria (controle positivo) conforme demonstrado na figura S2.

Para o cálculo da inibição do crescimento micelial, utilizou-se a equação 1 (EDINGTON et al., 1971), onde (R) é o diâmetro da testemunha e (D) o diâmetro do crescimento micelial de *Fusarium* no tratamento.

(1)

**2.4.2 – Antagonismo pelo método indireto**

Para a verificação de inibição do crescimento micelial decorrente da produção de compostos voláteis pelas linhagens bacterianas, placas de Petri com três divisões contendo meio BDA foram utilizadas. O fungo foi inoculado em uma das divisões da placa e a bactéria em outra divisão, sem contato entre eles (ROCHA et al., 2017), conforme mostrado na figura S3. As placas vedadas foram então incubadas a 30 ºC por 8 dias. A avaliação foi realizada a cada 2 dias, medindo o crescimento micelial do fungo em cada placa. Placas somente com o fungo *Fusarium* sp. foram utilizadas como controle para a comparação. Para a análise da inibição do crescimento micelial, utilizou-se o diâmetro do mesmo.

**2.5 – Produção de celulase por *Bacillus* spp.**

A produção de celulase foi detectada a partir do crescimento da bactéria em meio Glucose Yeast Extract Peptone Agar (GYP) - (glicose -1 g, extrato de levedura – 0,1 g, peptona – 0,5 g, ágar – 15 g, água destilada – 1 L), com 0,5% de carboxi-metil celulose, incubadas por 48 horas à 30 ºC (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Após a incubação, as placas foram submersas com uma solução de vermelho congo 0,2% e lavadas com NaCl 1 M por 15 minutos. A zona amarela formada em volta da colônia indicou a presença de celulase, e o cálculo do índice enzimático (IE) foi feito conforme descrito por Florencio et al., (2012) (Equação 2).

(2)

Onde:

* IE é o índice enzimático;
* DH é o diâmetro da hidrólise (cm);
* DC é o diâmetro da colônia (cm).

**2.6 – Teste de patologia em sementes de soja**

**2.6.1 – Preparo das ~~soluções~~ suspensões de *Bacillus* e *Fusarium* para a realização do teste de blotter**

A suspensão bacteriana foi preparada inoculando as linhagens em meio HIMEDIA® Soyabean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth) e incubadas em Shaker a 200 rpm por 48 horas a 30 ºC. A solução de bactéria obtida no cultivo foi diluída em água destilada estéril em diferentes concentrações (5%, 25%, 50% e 75% de cultivo bacteriano), sendo a amostra 100%, o cultivo bacteriano puro. Em seguida, as soluções foram colocadas em seus respectivos borrifadores estéreis. A suspensão de *Fusarium* foi feita conforme descrito no item 2.1.

**2.6.2 – Teste de Blotter**

O teste de Patologia (Teste de Blotter) foi realizado através do método de papel-filtro, seguindo as regras para análise de sementes do Manual de Análise Sanitária de Sementes disponibilizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. As sementes de soja (*Glycine max*) utilizadas (M8644IPRG, TO1786447061437, P70 CAT S2 Safra 17/17 Talismã Sementes®) receberam previamente assepsia com solução de hipoclorito de sódio a 1% , álcool 70% e água destilada, e foram semeadas nas caixas do tipo Gerbox. O mesmo procedimento foi feito para o controle, com ausência de *Bacillus* e *Fusarium* apresentando 5,3% de sementes infectadas, mostrando que não houve contaminação significativa das amostras controle.

**2.7 – Análise Estatística**

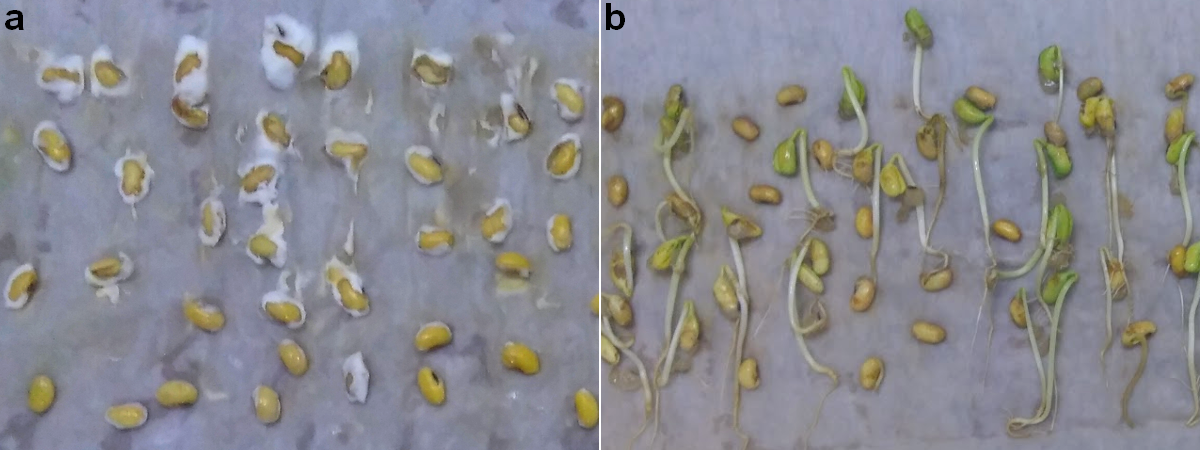
As análises estatísticas foram feitas através do software Graphpad Prism 7.0, utilizando o teste de variância one-way ANOVA e teste Tukey quando for constatado diferença significativa entre as amostras. Para análise do método indireto de inibição, além do one-way ANOVA, foi realizado o teste Dunnet, para comparar as amostras com seus respectivos controles. Para todos os testes foi considerado valor de p<0,05 de significância.

1. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**3.1 – Influência de *Fusarium* sp*.* na germinação de sementes de soja**

A figura 1a mostra o crescimento intenso de *Fusarium* spp sobre ~~as~~ sementes de soja mantidas em condições de germinação por xx dias. A ação do fungo se mostrou fortemente inibidora do processo de germinação, visto que em condições semelhantes, 17,8±4,2% das sementes de soja germinaram (Figura 1b) e na presença do fungo não houve germinação das sementes.

Figura 1. Dano causado na germinação em sementes de soja contaminadas (a) e não contaminadas (b) por *Fusarium* sp.



A ação inibidora da germinação da sementes de soja ~~por~~ *~~Fusarium~~* ~~sp spp??~~ observada na figura 1 foi atribuída ao crescimento de *Fusarium* quejá foi anteriormente reportado como causador ~~é responsável por~~ de diversas doenças fúngicas em plantas, tais como ~~dentre as mais importantes economicamente estão:~~ podridão de raiz, “damping off”, murchas vasculares, deterioração de sementes, além da produção de micotoxinas em grãos armazenados por algumas espécies do grupo (SUGA; HYAKUMACHI, 2004).

Perdas significativas de soja e milho ocasionadas por *F.~~usarium~~ verticillioides* já foram relatadas, principalmente quando associadas à ação do fungo sobre a semente na etapa de plantio, reduzindo a taxa de germinação, o vigor da planta, a produtividade da cultura, assim como a qualidade do produto colhido. Na soja, *F. solani* causa podridão vermelha da raiz ou síndrome da morte súbita, podendo afetar a raiz com seu apodrecimento e necrose da base da planta (GUIMARÃES, 2010).

**3.2 – Avaliação do antagonismo em cultura pareada**

**3.2.1 – Método Direto**

O teste de antagonismo baseado no método de cultura pareada que compara o crescimento micelial de um fitopatógeno em meio contendo o antagonista (*Bacillus*) estão ilustrados na figura S1. A tabela 1 mostra o crescimento micelial do Fusarium e a taxa de inibição de cada cepa de Bacillus, onde é possível observar que todas as linhagens de *Bacillus* spp. estudadas conseguiram interferir no crescimento do fungo *Fusarium* sp. por meio da produção de metabólitos antifúngicos.

Tabela 1. Efeito da inoculação de estirpes de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *Fusarium* sp. em substrato artificialmente infectado.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Bactéria** | **Crescimento micelial (cm)** | **% de inibição** |  |
| UFT- 47b | 2.5±0.1 | 69 | \* |
| UFT- 6 | 2.0±1.0 | 75 | \*\* |
| UFT- 38 | 5.0±0.5 | 38 |  |
| UFT- 31A | 5.2±0.7 | 35 |  |
| UFT- 8 | 6.5±0.9 | 19 |  |
| UFT- 13 | 6.3±0.9 | 22 |  |
| Controle | 8.1±0.2 | 0 |  |

As amostras com (\*) apresentaram diferença significativa quando comparadas com todas as demais amostras através do teste Tukey com p<0.05. A avaliação foi realizada no final de 7 dias.

Todas as amostras apresentaram percentual de inibição ~~em meio BDA~~ maior que 20% quando comparadas com a amostra controle. As linhagens de bactérias UFT-47b e UFT-06 apresentaram inibição significativa quando comparadas com as demais amostras, onde o *Fusarium* apresentou crescimento micelial de 2,5±0,1 e 2,0±1,0 cm, respectivamente, com percentual de inibição de 69% e 75%, respectivamente. A linhagem UFT-38, embora não tenha apresentado diferença significativa quando comparada com as demais amostras, apresentou percentual de 38% de inibição e, junto com as linhagens UFT-47b e UFT-06, foi selecionada devido a elevada capacidade de inibição de crescimento do fungo.

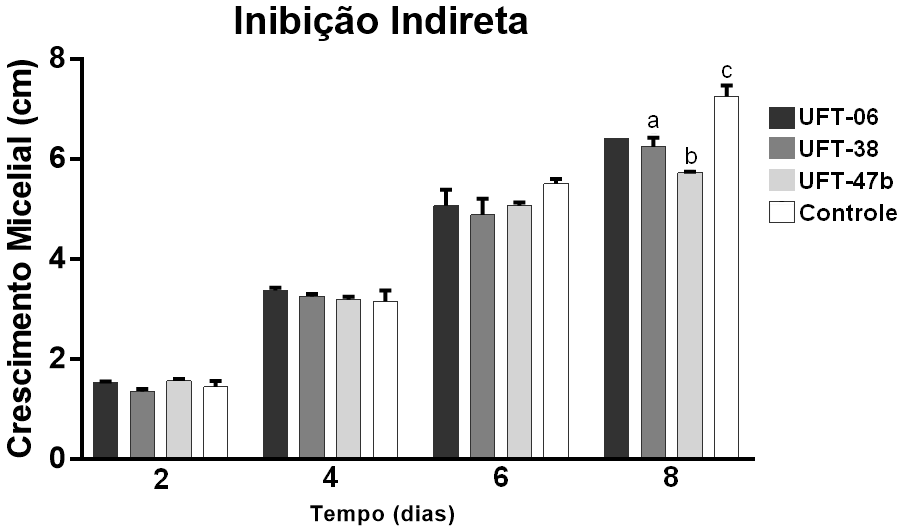
Segundo Fira et al. (2018), a maior parte dos trabalhos que investigaram bactérias do gênero *Bacillus* como agentes de biocontrole para diversas doenças causadas por fungos revelaram efeito antifúngico direto sobre fungos patogênicos, especialmente do gênero *Fusarium*, por *B. subtilis* pela produção de fungicidas. Cao et al. (2012) avaliou os efeitos do novo fertilizante bio-orgânico (BIO A) constituído de *Bacillus* no controle da doença chamada de “murcha de *Fusarium”* em pepino e conseguiram mostrar que o emprego de BIO A diminuiu significativamente o desenvolvimento da murcha de *Fusarium* e contribuiu para a produção de biomassa das plantas. Cavaglieri et al. (2005) analisou cepas de *Bacillus subtilis* com elevado poder de inibição contra *Fusarium verticillioides*, podendo ser empregados como um potencial agente de controle biológico contra danos causados pelo fitopatógeno em raízes de milho. Moléculas biologicamente ativas como iturinas, fengicinas e surfactinas são encontradas nos extratos antimicrobianos e algumas delas possuem potencial inibitório para o crescimento de fungos (RAAIJMAKERS et al., 2010). A estrutura anfifílica dos lipopeptídeos permite uma interação com membranas e causa-lhes danos estruturais ligados às modificações morfológicas irreversíveis aos conídios (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004; RAAIJMAKERS et al., 2010; ROMERO et al., 2007).

Enzimas e compostos orgânicos voláteis secretados por várias espécies que também foram estudados contribuem para essa inibição (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004; PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; DE VICENTE, 2011; ROMERO et al., 2007). Desta forma, as bactérias do gênero Bacillus têm sido consideradas bons agentes de biocontrole para diversas doenças causadas por fungos devido a sua habilidade de produzir grande variedade de compostos antimicrobianos (ROMERO et al., 2007; YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018; YANG et al., 2018). Estudos mostraram que linhagens de *Bacillus* inibem o crescimento micelial e germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum*, um dos maiores causadores de doenças em tremoço (*Lupinus mutabilis*), uma leguminosa nativa da América do Sul (YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018).

**3.2.2 – Antagonismo pelo método Indireto**

O potencial antagônico relacionado à produção de compostos voláteis (ROCHA et al., 2017) pela bactéria quando inoculada em meio contendo o fitopatógeno é mostrado na figura S3. O crescimento micelial de *Fusarium* sp. avaliado durante 8 dias pela produção de compostos voláteis pelas linhagens de *Bacillus* UFT-06, UFT-38 e UFT-47b é mostrado na figura 2.

Figura 2. Crescimento micelial de *Fusarium* sp. inoculado em placas contendo linhagens de *Bacillus* sp. em compartimentos separados.



Letras diferentes mostram diferença significativa entre as linhagens pelo teste ANOVA e teste Tukey com p<0.05.

O crescimento micelial do controle nos primeiros dias de análise apresentou-se lento e somente a partir do 6º dia conseguiu ultrapassar os confrontos indiretos. O crescimento micelial não diferiu significativamente do controle, mostrando que fazem parte de um mesmo grupo. Isso nos mostra que as linhagens UFT-06, UFT-38 e UFT-47b não obtiveram um potencial antagônico considerável contra *Fusarium* sp. através da produção de compostos voláteis.

Entretanto, a partir do oitavo dia, é possível observar diferença significativa no crescimento micelial das amostras UFT-38 e UFT-47b, a qual foi a mais eficiente retardando o desenvolvimento de *Fusarium* sp.

Apesar das linhagens de *Bacillus* estudadas neste trabalho não terem apresentado potencial inibição no crescimento micelial do fungo por compostos voláteis, segundo Jeong et al. (2017) as espécies de *Bacillus* produzem uma variedade de compostos voláteis que podem inibir o crescimento e esporulação fúngica, sendo um dos mecanismos de biocontrole para doenças causadas por fungos.

**3.4 – Produção de Celulase**

Tabela 2. Produção de celulase por *Bacillus* spp através da quantificação do índice enzimático, que corresponde ao diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia.

|  |  |
| --- | --- |
| **Índice Enzimático** | |
| UFT-06 | 0.88±0.12 |
| UFT-38 | 1.30±0.27 |
| UFT-47b | 2.01±0.12 |

A determinação do índice enzimático revela se as cepas analisadas são capazes de metabolizar carboximetilcelulose (celulases positivas). No presente estudo, nenhuma linhagem apresentou atividade celulolítica significativa, embora sejam positivas para celulase. Lealem & Gashe (1994), em seu estudo na produção de amilases por *Bacillus*, considerou cepas com o índice enzimático ≥ 2 como potenciais microrganismos amilolíticos.

Diversos fatores influenciam no processo de germinação e mudanças morfológicas e fisiológicas de sementes (KUMAR; KUMAR; PRATUSH, 2014), tais como a umidade, temperatura e produção de hormônios como as giberelinas que induzem a produção de enzimas hidrolíticas que desempenham importante papel na degradação das reservas presentes no endosperma das sementes (MEREDITH; POMERANZ, 1985).

Por este motivo, é de grande interesse a aplicação não só de celulases, mas também de outras enzimas hidrolíticas na agricultura. Vários estudos reportam a aplicabilidade das enzimas hidrolíticas secretadas por microrganismos em controlar doenças em plantas, além de facilitar a germinação de sementes e melhorar o crescimento das culturas (BEHERA et al., 2016).

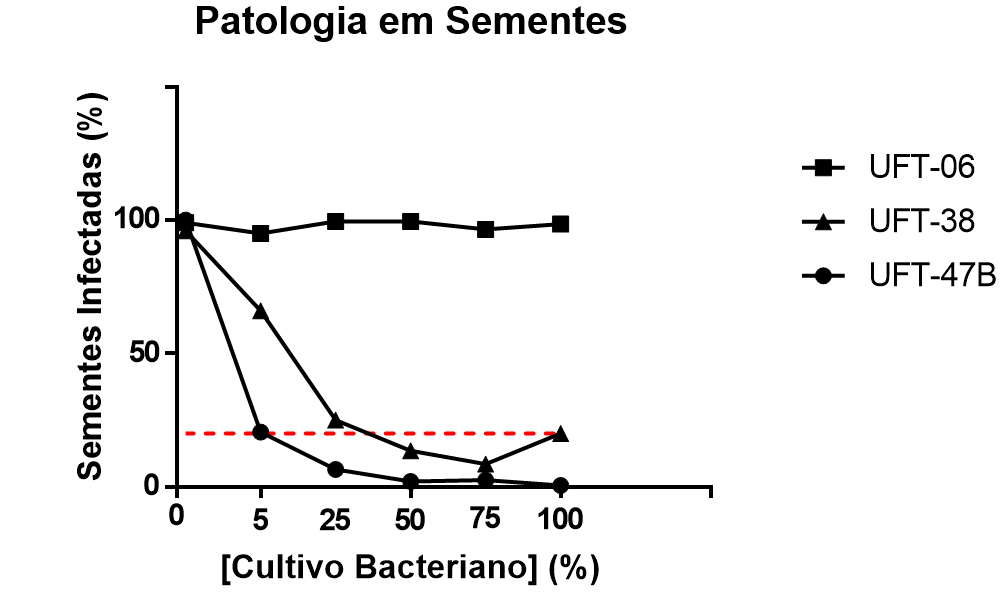
É conhecido que algumas espécies de Bacillus secretam celulase e que *B. amyloliquefaciens* pode produzir celulase e outros compostos conforme mostrado por ROCHA et al., (2017) e GOWTHAM et al. (2016). O aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitohormônios e melhoria das condições de solo são características que explicam sua atuação, promovendo a rápida germinação de sementes e levando a um rápido desenvolvimento da plântula, permanecendo menos tempo no campo, o que minimiza a contaminação por patógenos e agentes externos (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

**3.5 – Teste de Patologia inoculando *Bacillus* spp. em sementes de soja para controle de *Fusarium* sp.**

O teste de Patologia (Teste de Blotter) permitiu a observação dos fungos que se desenvolveram no hospedeiro *in situ*, sem perturbação, numa condição natural de crescimento conforme mostra a figura S4.

O percentual de inibição de sementes infectadas por *Fusarium* sp. foi analisado e a linhagem UFT-47b e UFT-38 apresentaram os melhores resultados para a inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico. Concentrações de cultivo bacteriano de 5% para UFT-47b e de 25% para UFT-38 são capazes de reduzir o percentual de sementes infectadas em cerca de 80% conforme mostra a figura 3.

Figura 3. Teste de patologia (Blotter) em sementes de soja contaminadas por *Fusarium* sp. quando embebidas em cultivo bacteriano de cada linhagem de *Bacillus* spp. em diferentes concentrações. A linha vermelha tracejada representa o valor limite para considerar o *Bacillus* spp. como um antagonista adequado apresentando pelos menos 80% de inibição da infecção por *Fusarium* sp.



A semente é o principal elemento no estabelecimento, expansão, diversificação e desenvolvimento da agricultura e para que seja garantida a sua função de perpetuação e multiplicação das espécies, é essencial, dentre outros fatores, que ela possua elevado potencial fisiológico e ausência de patógenos (RAMOS et al., 2014), uma vez que é ela quem transporta todo o potencial genético da espécie.

Para a UFT-06 o percentual de sementes infectadas variou de 95 a 100% em todas as concentrações de cultivo bacteriano não revelando efeito positivo de controle biológico, embora tenha apresentado os melhores valores percentuais de inibição do crescimento micelial do fungo *Fusarium* através do teste direto de antagonismo (seção 3.2.1). Entretanto, vale ressaltar que neste teste, duas repetições apresentaram problemas de contaminação que podem ter influenciado no resultado significativo no confronto direto e não no teste de patologia.

O efeito *in situ* de *Bacillus*, pode promover crescimento ou biocontrole por diversos mecanismos, sendo o de antibiose o mais frequente. A antibiose é uma forma de inibição de grande espectro que ocorre devido a produção de substâncias tóxicas aos fungos, sendo a mais efetiva dos mecanismos (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003).

Estudos *in vitro* mostram que *Bacillus* são agentes de biocontrole de fitopatógenos de soja como: *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Phomopsis* sp. (ARAÚJO; HENNING; HUNGRIA, 2005). Em soja, *Bacillus thuringiensis* inibiu 55% do crescimento de *Fusarium* sp. pela produção de quitinase (REYES‐RAMÍREZ et al. 2004). Velho et al. (2011), em seu estudo, observou a presença de lipopeptídeos do grupo das iturinas em espécies de *Bacillus* que inibiram o crescimento *in vitro* de *Aspergillus* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* e *Fusarium graminearum*.

1. **CONCLUSÃO**

Isolados de *Bacillus* possuem grande potencial como agentes de controle de fitopatógenos, em especial contra *Fusarium* sp., o qual é capaz de causar danos irreversíveis em sementes inibindo sua germinação. As linhagens *Bacillus* sp. UFT-47B e UFT-38 demonstraram resultados significativos em sementes de soja, com maior porcentagem de inibição de crescimento micelial. Este efeito pode estar relacionado à síntese de substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutrientes ou por mecanismos de resistência sistêmica induzida. A inoculação de *Bacillus* spp. em sementes de soja, mostrou-se efetiva e promissora como possível alternativa no tratamento de sementes e controle de fitopatógenos.

1. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AMIN, M.; RAKHISI, Z.; AHMADY, A. Z. Isolation and Identification of *Bacillus* Species From Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, n. 1, p. 10–13, 2015.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8–9, p. 1639–1645, 2005.

BACH, E. et al. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 99, p. 141–149, 2016.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. **Plant Physiology**, v. 134, p. 307–319, 2004.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEHERA, B. C. et al. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 197–210, 2016.

BRAGA JUNIOR, G. M. et al. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 45–51, 2017.

CAO, Yun et al. Isolation and identification of lipopeptides produced by B. subtilis SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. **Scientia horticulturae**, v. 135, p. 32-39, 2012.

CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of Bacillus subtilis against Fusarium verticillioides in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 748-754, 2005.

DOURIET-GÁMEZ, N. R. et al. Genomic Analysis of Bacillus sp. Strain B25, a Biocontrol Agent of Maize Pathogen Fusarium verticillioides. **Current Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 247–255, 2017.

EDINGTON, L. V.; KHEW, K. L. AND BARRON, G. L. (1971), Fungitoxic espectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, **61**: (1), 42-44.

EL-BENDARY, M. A.; HAMED, H. A.; MOHARAM, M. E. Potential of *Bacillus* isolates as bio-control agents against some fungal phytopathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 173–178, 2016.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by Bacillus species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FOYSAL, M. J.; LISA, A. K. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. strain BC01 from soil displaying potent antagonistic activity against plant and fish pathogenic fungi and bacteria. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, p. 5–10, 2018.

GOULART, A. C. P. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. 2. ed. rev. e ampl. 71p. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

GOWTHAM, H. G. et al. Application of rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* for the management of *Fusarium* wilt in tomato. **Rhizosphere**, v. 2, p. 72–74, 2016.

GUIMARÃES, S. da S. C. ***Fusarium solani* Associado á soja no Brasil: Morfologia, Filogenia molecular e Patogenicidade**. 2010. 65 p. Tese (doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycological Society of America**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975.

JEONG, M. H. et al. Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 645–653, 2017.

KANT, P. et al. Disease Resistance/Pathology/*Fusarium*. Second Edi ed.: **Elsevier B.V.**, 2011. v. 4.

KUMAR, Ajay; KUMAR, Amit; PRATUSH, Amit. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of Bacillus species. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 312, 2014.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251–257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram‐positive bacterium isolated from fermenting tef (Eragrostis tef). **Journal of Applied bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

MACHADO, J. da C. et al. Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 213–217, 2013.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Tradução Andrea Queiroz Maranhão et al. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1091 p

MEREDITH, P.; POMERANZ, Y. Sprouted grain. In: POMERANZ, Y. (Ed.). **Advances in cereal science and tecnology**. Saint Paul: A.A.C.C, v. 7, p. 239-320, 1985.

PEDROZO, R.; LITTLE, C. R. *Fusarium verticillioides* inoculum potential influences soybean seed quality. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 3, p. 749–754, 2017.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187–193, 2011.

RAAIJMAKERS, J. 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.

RAHMAN, M. M. E. et al. Suppressive effects of Bacillus spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of Sclerotinia sclerotiorum and potential as biological control of white mold on mustard. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 1, p. 103–117, 2016.

RAMOS, D. P. et al. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 44, n. 1, p. 24–31, 2014.

REYES‐RAMÍREZ, A. et al. Antifungal activity of Bacillus thuringiensis chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. M131-M134, 2004.

ROCHA, F. Y. O. et al. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. **Applied Soil Ecology**, v. 120, p. 8–19, 2017.

ROMERO, D. et al. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 969–976, 2007.

STEWART, G. S. et al. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. **Biochemical Journal**, v. 198, n. 1, p. 101-106, 1981.

SUGA, H.; HYAKUMACHI, M. Genomics of phytopathogenic fusarium: **Elsevier Masson SAS**, 2004. v. 4.

VELHO, R. V. et al. Production of lipopeptides among Bacillus strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. **Folia microbiologica**, v. 56, n. 4, p. 297, 2011.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V.; FALCONÍ, C. E. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on *Andean lupin* seeds by lipopeptide production. **Biological Control**, v. 122, p. 67–75, 2018.

YANG, L. et al. Screening *Bacillus* species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* on wheat. **Biological Control**, v. 118, p. 1–9, 2018.

YUAN, J. et al. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5942–5944, 2012.

ZHANG, J. X.; XUE, A. G.; TAMBONG, J. T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel Bacillus subtilis strains for control of soybean root rot caused by Fusarium oxysporum and F. graminearum. **Plant Dis**. 93:1317-1323.

1. **MATERIAL SUPLEMENTAR**

Figura S1. Seleção de bactérias com atividade antagônica ao fungo *Fusarium* sp.

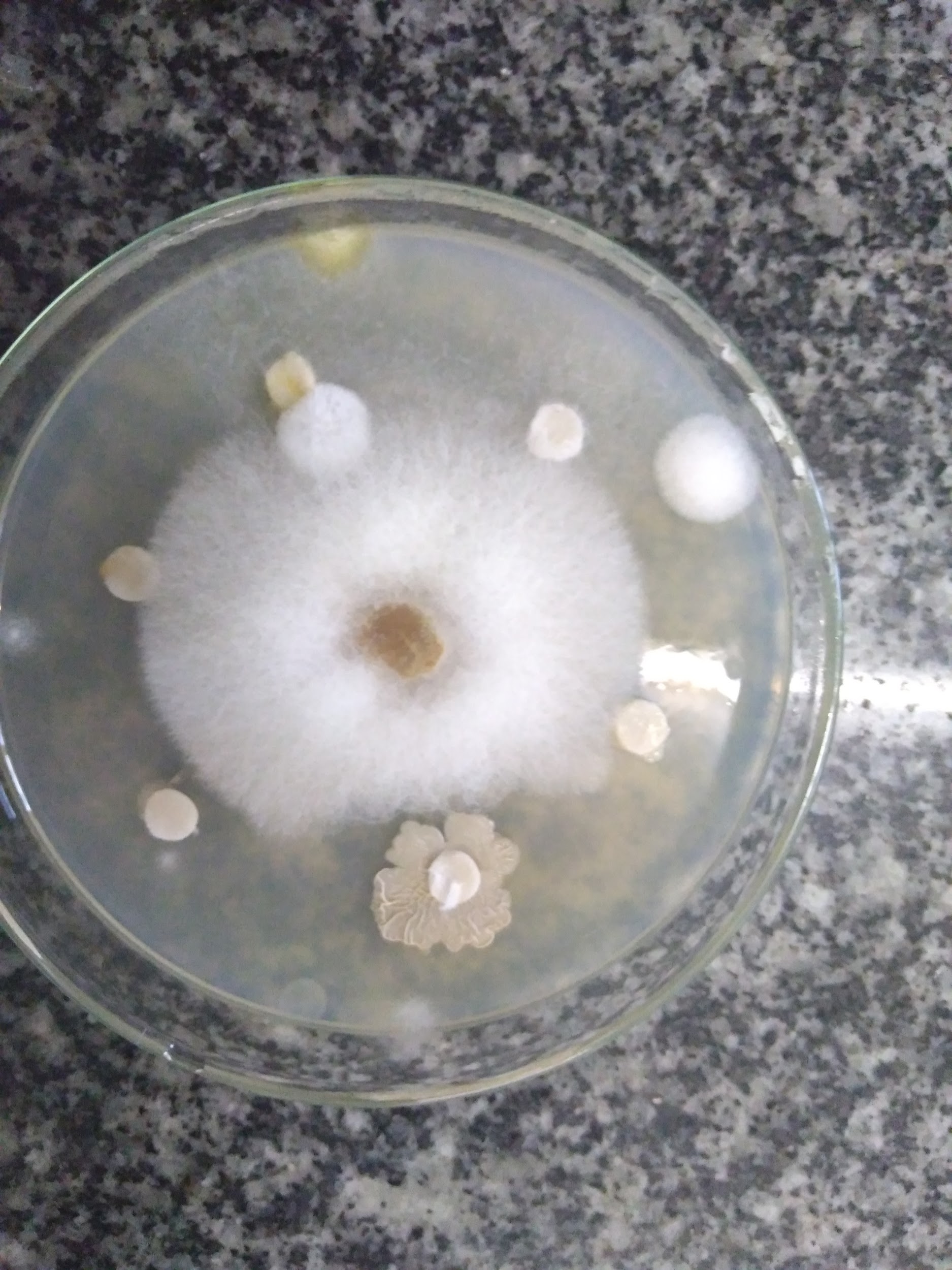


Figura S2. Crescimento micelial de *Fusarium* sp. (seta vermelha) em placas com linhas paralelas com cada linhagem de *Bacillus* sp. (setas azuis) avaliadas pelo método de cultura pareada.

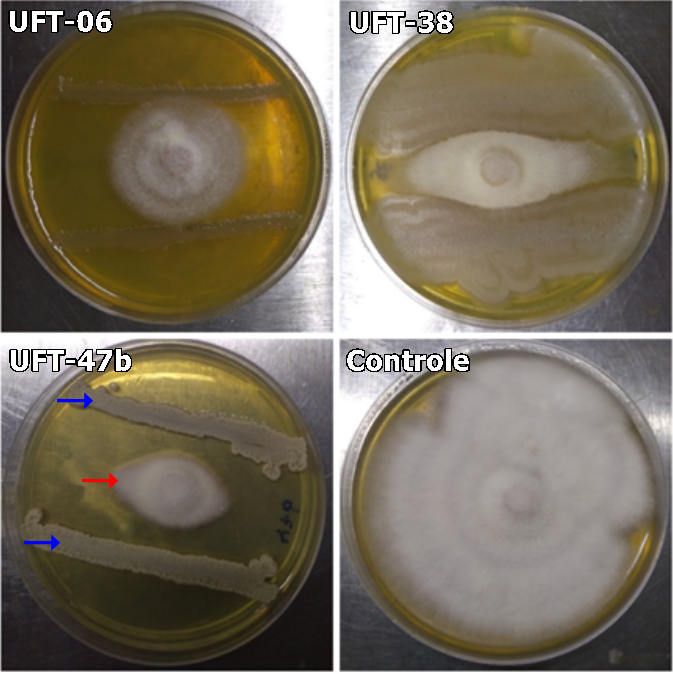


Figura S3. Crescimento micelial de *Fusarium* sp. por *Bacillus* ssp. através da produção de compostos voláteis.

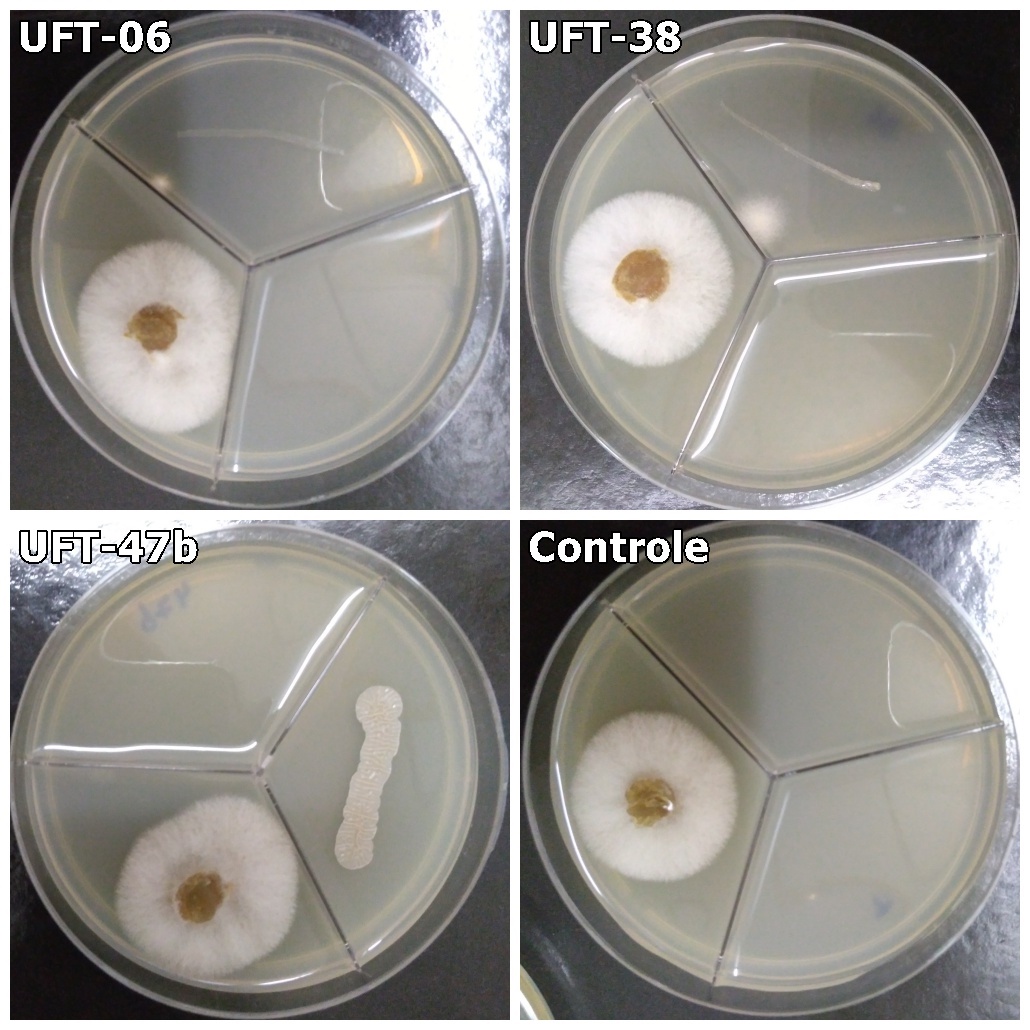


Figura S4. Análise da qualidade de sementes de soja tratadas com *Bacillus* spp. em diferentes concentrações. A infecção por *Fusarium* sp. em sementes é caracterizada pela formação de micélios brancos e densos na superfície da semente.

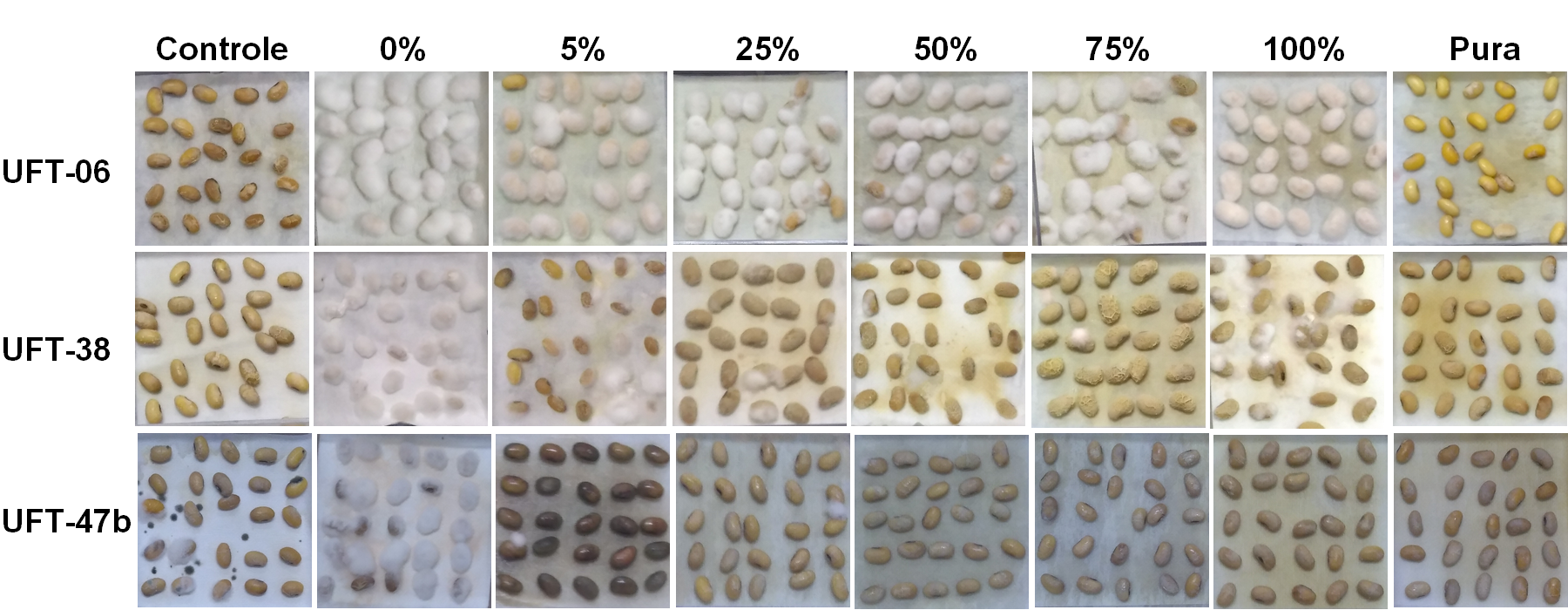


Tabela S1. Crescimento micelial de *Fusarium* sp. em placas contendo linhagens de *Bacillus* ssp. em setores separados.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tempo (dias)** | **Crescimento Micelial (cm)** | | | |
| **UFT-06** | **UFT-38** | **UFT-47B** | **Controle** |
| 2 | 1.53±0.03 | 1.35±0.04 | 1.56±0.06 | 1.43±0.10 |
| 4 | 3.37±0.10 | 3.25±0.07 | 3.18±0.05 | 3.15±0.18 |
| 6 | 5.07±0.34 | 4.88±0.27 | 5.06±0.07 | 5.50±0.09 |
| 8 | 6.40±0.08 | 6.23±0.18 | 5.73±0.01 | 7.25±0.20 |

Tabela S2. Teste de Dunnett, utilizado para realizar comparações múltiplas onde apenas um tratamento é usado como referência, para avaliação do antagonismo pela produção de compostos voláteis com N sendo o número de amostras em cada cepa.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Cepa** | **N** | **Média** | **Agrupamento** |
| Controle | 5 | 4,9 | A |
| UFT-06 | 5 | 4,5 | A |
| UFT-38 | 5 | 4,3 | A |
| UFT-47B | 5 | 4,2 | A |

As médias rotuladas com a letra A não apresentaram diferença significativa quando comparadas com a média do nível controle*.*

Artigo submetido como avaliação na disciplina de Redação Científica em Biotecnologia do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Professor: André Luis Ferraz

Alunos: Célia Regina Andrade dos Santos, Lenise Cristina Battisteli, Samara Cardoso Alves e William Vinícius de Mello Mira.