

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus spp.* FRENTE A PATÓGENOS
RADICULARES**

BEATRIZ RAYANA DAMÁSIO DE ANDRADE

RECIFE

2022

BEATRIZ RAYANA DAMÁSIO DE ANDRADE

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus spp.* FRENTE A PATÓGENOS
RADICULARES**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. José de Paula Oliveira.

Co-orientador: Dra. Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva.

Recife, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A554a Rayana Damásio de Andrade, Beatriz
ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus* spp. FRENTE A PATÓGENOS RADICULARES: ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus* spp. FRENTE A PATÓGENOS RADICULARES / Beatriz Rayana Damásio de Andrade. - 2022.
35 f. : il.
- Orientador: Jose de Paula Oliveira.
Coorientador: Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2024.
1. controle biológico. 2. antagonismo. 3. feijão-caupi. 4. doenças radiculares. 5. fungicidas . I. Oliveira, Jose de Paula, orient. II. Silva, Maria Luiza Ribeiro Bastos da, coorient. III. Título

BEATRIZ RAYANA DAMÁSIO DE ANDRADE

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus spp.* FRENTE A PATÓGENOS
RADICULARES**

Comissão Avaliadora:

Prof^o Dr^o José de Paula Oliveira – IPA
Orientador

Prof^a MSc^a Túlio Alexandre Freire Silva – UFRPE
Titular

Prof^o Dr^o Marcia Nieves Carneiro da Cunha – UFRPE
Titular

Prof^a Dr^a Eric Xavier de Carvalho – IPA
Suplente

Recife, 2022

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 FEIJÃO CAUPI.....	10
2.2 PATÓGENOS DO FEIJOEIRO.....	11
2.3 CONTROLE DOS PATÓGENOS DO FEIJÃO-CAUPI	14
2.4 CONTROLE QUÍMICO	15
2.5. CONTROLE BIOLÓGICO.....	16
2.6. <i>Bacillus</i> spp.	18
3. REFERÊNCIAS	19
4. CAPÍTULO 1	
ATIVIDADE ANTAGONISTA DE <i>Bacillus</i> spp. FRENTE A PATÓGENOS RADICULARES	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação morfológica, fisiológica e bioquímica dos isolados do solo.
..... 30

Tabela 2 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos patógenos radiculares de feijão-caupi sob ação do *B.subtilis* (ATCC 6633) e isolado IPA 12531

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Atividade antagônica *in vitro* do isolado IPA 125 frente aos patógenos *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* s *fp tracheiphilumi*, respectivamente 33

Figura 2 - Crescimento celular, consumo de oxigênio e pH durante a fermentação do isolado *Bacillus* sp. IPA 125..... 34

RESUMO

No Brasil, a produção de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é prejudicada por vários fatores, principalmente as doenças radiculares causadas por fungos. Devido aos danos significativos ocasionados por esses agentes nas lavouras de feijão, agricultor vem intensificando uso de compostos químicos, acarretando, por conseguinte, em uma série de danos irreparáveis ao meio ambiente e ao ser humano. Como alternativa aos impactos ocasionados pelo uso dos fungicidas, estudos voltados para utilização de agentes de biocontrole, em especial bactérias do gênero *Bacillus* spp, têm aumentado em importância, visto que apresentam uma variedade de mecanismos de ação antifúngicas. Desta forma, a presente pesquisa objetivou selecionar microrganismos do gênero *Bacillus* com potencial uso no biocontrole de fitopatógenos acometidos nas plantações de feijão-caupi. Deste modo, as bactérias do gênero *Bacillus* foram isoladas de amostras de solo coletadas no município de Cedro- PE, e submetidas a tratamento térmico; após isso, 12 isolados foram selecionados e submetidos a testes morfofisiológicos, bioquímicos e antagônicos. A morfologia bacteriana foi observada através da coloração de Gram, no qual foi identificado a forma bacilar dos microrganismos, sendo, por conseguinte inoculados em meios bioquímicos específicos para a seleção de bactérias com características similar ao *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Após o processo seletivo, foi executado o teste de pareamento de culturas em placa de Petri, onde, a atividade antagônica das bactérias isoladas foram avaliadas frente aos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* e *Macrophomina phaseolina*. Os resultados obtidos evidenciaram que apenas o isolado IPA 125 foi capaz de inibir o crescimento micelial *in vitro* apresentando uma elevada atividade antagônica frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *macrophomina phaseolina*, sendo obtidos halos de $88,4 \pm 1,2$ C, $88,3 \pm 2,5$ C e $53,9 \pm 3,1$ a respectivamente. Dessa forma, esse estudo contribui e permite vislumbrar a utilização *Bacillus* spp. IPA 125 na produção de biofungicidas com potencial supressor a doenças radiculares acometidas nas sementes de feijão- caupi.

Palavras chaves: controle biológico, antagonismo; feijão-caupi; doenças radiculares; fungicidas

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa originária do continente africano que foi trazida e introduzida no Brasil através da colonização portuguesa no século XVI. Devido a sua adaptabilidade, resistência a doenças e a secas sua cultura passou a integrar um dos principais cultivos de subsistência das regiões norte e nordeste do Brasil (SOUZA, 2021). Porém, apesar da sua rusticidade, o feijão-caupi apresenta susceptibilidades diante das adversidades ambientais, nos quais são capazes de reduzir e inviabilizar a produção local (DEMARTELAERE *et al.*, 2021).

Dentre os fatores que oneram a cultura do feijão-caupi destacam-se os patógenos radiculares, principalmente os fungos patogênicos tais como *Rhizoctonia Solani*, *Fusarium spp.*, e *Macrophomina phaseolina* (SOBRINHO *et al.*, 2020). A incidência desses agentes patogênicos nas áreas de plantio, associados aos fatores hídricos e temperatura, ocasiona prejuízos significativos à economia, que resultou em perdas de até 40% na segunda safra em 2020/2021, no estado de Pernambuco (SILVA, 2021; CONAB, 2021). Para tentar minimizar os danos causados por esses agentes fúngicos ao agronegócio, produtores vêm intensificando de forma indiscriminada o uso de compostos químicos para favorecer a produtividade, bem como o manejo da doença nas plantações de feijão. Entretanto, a utilização exacerbada desses agentes químicos tem intensificado os impactos ambientais, uma vez que apresentam em sua composição princípios ativos tóxicos com amplo espectro de ação (MONTALVÃO, 2016).

Em virtude das adversidades decorrentes da utilização indiscriminada dos agroquímicos e de seus respectivos danos, o interesse por estratégias eficientes e ambientalmente seguras têm se intensificado. O aumento da importância de microrganismos endofíticos como ferramenta de biocontrole de fitopatógenos radiculares em diferentes culturas apresenta-se como uma alternativa promissora, pois apresentam capacidade tanto de reduzir quanto de eliminar a presença dos fungos patogênicos na área de plantio (LANNA, *et al.*, 2010).

Dentre os microrganismos utilizados no controle de fungos patogênicos, destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus spp.*, pois apresentam características que propiciam alta capacidade competitiva e sobrevivência em nichos ecológicos adversos (EINLOFT, 2016). Essa habilidade competitiva está relacionada à grande versatilidade de mecanismos de ação desempenhado pelo *Bacillus*, a exemplo

disso temos a síntese de substâncias deletérias, como também a competição por nutrientes e espaço. Em especial, as bactérias pertencentes a esse gênero detêm excelentes vantagens de sobrevivência, visto que apresentam estruturas de resistência, endósporo, que confere a esta manutenção em condições ambientais desfavoráveis, como variações drásticas de parâmetros físico-químicos do meio (temperatura, disponibilidade hídrica ou a disponibilidade de fontes de carbono) (SHIOM et al.,2008; CARVALHO *et al.*, 2011).

Embora o gênero *Bacillus* possua características importantes para o controle biológico, a espécie *Bacillus subtilis* se destaca por possuir de 4 a 5% de seu genoma dedicado a síntese de antibióticos, totalizando mais de duas dúzias de compostos antimicrobianos (STEIN, 2005). Dentre os compostos produzidos com potencial para atividade antifúngica destacam-se os lipopeptídeos cíclicos, sufactinas, fengicinas e as iturinas, que devido a sua estrutura química conseguem ter acesso a membrana celular do fungo, levando a um extravasamento citoplasmático acarretando a morte da célula (EINLOFT,2016).

Essa capacidade antifúngica tornou a espécie de *B.subtilis* como a principal bactéria utilizada na produção de biofungicidas comerciais, tendo como alvo os principais fitopatógenos para culturas específicas, tais como: Serenade (Vinhedos, nozes, legumes e frutíferas), Kodiak (Algodão, legumes e soja), Subtilex (Ornamentais, culturas de campo e legumes). Esse potencial antifúngico, pode apresentar diferenciação na fabricação dos bioformulados uma vez que os microrganismos, mesmo pertencentes à mesma espécie, apresentam características competitivas únicas, diferenciando os isolados em capacidade de sobrevivência, adaptabilidade e eficácia (Pérez-Garcia et al., 2011).

Contudo, com o objetivo de se obter agentes de controle biológico potencialmente eficientes frente a fitopatógenos do feijão-caupi, esse trabalho realizou uma seleção de bactérias do gênero *Bacillus* spp., isoladas do solo de cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp do município de Cedro- PE, para avaliar *in vitro* seu potencial antagônico contra os fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *Rhizoctonia solani*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FEIJÃO CAUPI

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) comumente conhecido como feijão-fradinho, de corda ou macassar, é uma dicotiledônea de origem africana pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboidea* e gênero *Vigna*. Essa espécie de feijão integra uma das principais culturas de subsistência das regiões norte e nordeste do Brasil, sendo uma importante fonte nutricional na dieta da população de países em desenvolvimento, uma vez que apresentam um elevado teor de proteínas e carboidratos, além de fibras alimentares, vitaminas e minerais, como também a baixa quantidade de gordura (MELO,2019; ROCHA et al., 2017).

Por seu valor nutritivo e alta adaptabilidade, às condições ambientais distintas, o feijão caupi vem se expandindo nas áreas agrícolas do Brasil, apresentando, em 2019, uma produção e produtividade equivalentes a 700 mil toneladas e 545 kg/ha¹. Sua produção está concentrada na região Nordeste, sobretudo no semiárido dos estados do Piauí, Bahia e Ceará, alcançando cerca de 398 mil toneladas com um rendimento médio de 394 kg/ha¹. (CONAB, 2021; EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2020). Especificamente, no ano de 2021, o estado de Pernambuco, em especial na mesorregião do sertão (chapada do araripe e regiões serranas), obteve em sua produção final aproximadamente 24,1 mil toneladas distribuídos em 104,7 mil hectares (CONAB,2021).

Apesar da grande produtividade, o feijão-caupi é principalmente cultivado por pequenos produtores da agricultura familiar onde seu cultivo está voltado para a produção de grãos, verdes ou secos, no qual podem ser consumidos *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, as plantas podem ser utilizadas para alimentação animal e adubos verdes na agricultura (CRUZ, 2021).

Embora o feijão-caupi seja uma espécie exótica, que possui uma baixa exigência hídrica e baixos suprimentos essenciais para o seu desenvolvimento, assim como qualquer outra espécie está suscetível às condições ambientais bióticas do qual está inserido, podendo ser afetada ou inviabilizada pela incidência de doenças, entre as quais aquelas provocadas por fungos radiculares. Embora haja outros patógenos envolvidos num complexo de fungos que causam doenças no caupi, especificamente, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* são considerados os mais prejudiciais. (SILVA,2021; GOUVEIA et al .,2021; VIEIRA et al., 2010).

Os prejuízos decorrentes da incidência dessas doenças provocadas por *R. solani* nas lavouras, chegaram a atingir até 80% de desfolha em genótipos de feijão-caupi de porte ereto em plantios de Roraima (Nechet; Halfeld-Vieira, 2007) e de perdas de até 50% na região da Transamazônica no estado do Pará. Além das problemáticas ocasionadas pelo fungo *R. solani* nas lavouras de feijão, Segundo Poltronieri et al. (1994) no Pará a podridão cinzenta do caule provocada pelo patógeno *Macrophomina phaseolina* vem sendo a segunda doença em ordem de importância referente à percentagem de ataque e severidade, comprometendo a produção desse grão como também perda econômica dos produtores.

2.2 PATÓGENOS DO FEIJOEIRO

2.2.1 *Macrophomina phaseolina*

Macrophomina phaseolina é um fungo polífago de solo pertencente ao Filo Ascomycota, Sub Filo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Ordem Botryosphaerales, Família Botryosphaeriaceae. Esse gênero é caracterizado pela formação de estruturas designadas como microescleródios e picnídios (estrutura reprodutiva). Estas estruturas primárias de resistência denominadas de microescleródios, servem como fontes de dispersão do patógeno no campo, onde em condições adversas podem perdurar no solo por longos períodos, entre 2 a 15 anos. (MARQUEZ *et al.*, 2021; RAMTEKE. 2012;).

Sob condições de altas temperaturas (30 °C - 35°C) do solo e baixo potencial hídrico, os microescleródio, principal fonte de inóculo, iniciam o seu processo de germinação, bem como a produção de massa de hifas, nas quais colonizam-se na epiderme do hospedeiro no estágio de plântula. Que em seu primeiro contato com raízes, conseguem atingir o sistema vascular, impedindo o transporte de nutrientes e água para as partes superiores do vegetal, causando danos com maior intensidade nas culturas de feijão-caupi. (POLTRONIERI *et al.*, 1994; BELLE & FONTANA, 2018).

M. phaseolina é um parasita facultativo que coloniza o hospedeiro de forma intra e intercelularmente. Possui um amplo espectro de ação sob os hospedeiros, infectando em torno de 500 espécies de flora em mais de 100 famílias. Esse patógeno, é responsável por causar infecções como podridão do carvão, praga das plântulas, podridão do caule e da raiz, sendo capaz de infectar o feijão-caupi em todos os estágios de seu desenvolvimento (MARQUEZ *et al.*, 2021).

Segundo Dhingra & Sinclair (1978) a disseminação do fungo de um campo para outro está comumente relacionada com os implementos agrícolas, vento, animais, águas de irrigação, assim como também, através das sementes contaminadas. Esses parasitas, nas regiões norte e nordeste do Brasil, apresentam maiores níveis de ocorrências, uma vez que retratam condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento, acarretando perdas substanciais de produtividade que podem chegar a 100% no rendimento da cultura (SILVA, 2021; CARDOSO, 1990).

As plantas infectadas, geralmente, apresentam as sintomatologias como senescência das folhas e amarelecimento, escamação dos tecidos corticais do caule inferior e da raiz principal e presença de uma coloração acinzentada desses tecidos em consequência do quantitativo de micro escleródios presente no local, sendo eles capaz de resultar na morte prematura da planta (MARQUEZ et al., 2021; MENGISTU et al., 2011; BIANCHINI; MARINGONE; CARNEIRO, 2005).

2.2.2 *Rhizoctonia solani* Kuhn

Rhizoctonia solani é basidiomiceto necrotrófico, cosmopolita e onipresente no solo que inflige danos a diversas culturas economicamente importantes. Esta espécie é considerada um dos principais fungos patogênicos de plantas responsável por provocar perdas anuais de rendimento de colheita (20-40%) em todo o planeta (ABBS et al., 2019). Por apresentar características como, agressividade patogênica, capacidade de competição saprofítica, além de possuir um amplo espectro de ação em hospedeiros e produção de esclerócios. A estratégia de manejo desse agente em culturas torna-se muito difícil (GOUVEIA et al., 2021).

O agente causal da rizoctoniose também conhecida como mela ou requeima é um dos responsáveis pelo tombamento (damping off) de plântulas de feijão-caupi. Os sintomas da doença ocorrem geralmente nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, tendo o solo como a principal fonte de ataque, causando podridões de raízes, redução do crescimento, murchas de folhas, podridão de sementes, presença de lesões pardo-avermelhadas bem delimitadas e deprimidas (cancros) na base do caule resultando no tombamento de mudas (Kalim et al., 2003; SOBRINHO et al., 2020).

O fungo *R. solani* em sua forma sexuada corresponde ao basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. Entretanto, sua fase assexual ocorre

mundialmente, promovendo severas doenças em uma diversidade de plantas cultivadas (OLIVEIRA, 2011;). Em altas temperaturas do solo associada com elevada umidade relativa e com períodos prolongados de chuvas, à uma intensificação da agressividade desse patógeno, uma vez que as condições favorecem o seu desenvolvimento. A sua disseminação, em campo, está interligada normalmente pelo uso de maquinário, implementos agrícolas, e águas da superfície, bem como pelo ar (POLTRONIERI et al., 1994; REIS & LOPES, 2011).

2.2.3 *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*

Pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hipocreais, Família Nectriaceae (MICHIELSE & REP, 2009). O *Fusarium* é um gênero de fungos filamentosos que engloba importantes fitopatógenos de plantas e contaminantes produtores de micotoxinas de alimentos. Com mais de 120 *formae speciales*, o *Fusarium oxysporum* é considerado como o quinto entre os 10 principais patógenos de importância científica/ econômica (SAMPAIO et al., 2020).

O *F. oxysporum* é um fungo cosmopolita que parasita uma vasta variedade de plantas, acarretando a murcha de fusarium, que é uma síndrome vascular letal acometida em hortaliças, leguminosas, flores e culturas de campo. Esse patógeno se reproduz de forma assexuada através da formação de esporos do tipo clamidósporos. Uma vez inseridos em condições desfavoráveis, essas estruturas de resistência permanecem em estado de dormência por longas estações, atingindo aproximadamente 30 anos (JOSHI, 2018; GRANADA et al., 2001).

Por apresentar inúmeras *formae speciales*, nas quais se especializaram em atacar diversos hospedeiros. Em virtude desse fator, os diversos cultivares de caupi podem apresentar reações diversificadas a cada uma delas (LAZAROTTO, 2013). A fusariose acometida pelo *F. oxysporum f. sp. tracheiphilum*, apresenta sintomatologia bastante típica nas plantações de caupi, como a presença de folhas amareladas que secam e caem. Os sintomas caracterizam-se, primeiramente, pela redução do crescimento da planta, que ao progresso da doença ocasiona clorose acompanhada de queda prematura das folhas, que ao evoluir, gera murcha e morte do vegetal (VIEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2019).

A doença se manifesta, normalmente, em condições que favorecem a temperatura do solo e ar em torno de 28°C. Onde permite a germinação e o

alongamento dos esporos fúngicos em direção às raízes da planta hospedeira, viabilizando sua penetração. Uma vez dentro da raiz, as hifas invadem o córtex radicular, atingindo o sistema vascular, onde irá se multiplicar e colonizar até a completa murcha da planta. Após ocasionar a morte total do hospedeiro, o parasita inicia sua fase de esporulação profusa na região da superfície da planta, dispersando estruturas na fase de micro e macroconídios no solo. Normalmente, essa infecção surge em reboleiras que vão ascendendo à medida que a área continua a ser plantada com a mesma cultura. (BELLE & FONTANA, 2018 & VIEIRA *et al.*, 2010; SAMPAIO *et al.*, 2020).

2.3 CONTROLE DOS PATÓGENOS DO FEIJÃO-CAUPI

Na agricultura moderna o tratamento de sementes a base defungicidas é um controle preventivo contra patógenos radiculares em que possibilita a proteção da cultura desde a germinação até a fase inicial de desenvolvimento. Mas, apesar dos benefícios advindos do tratamento químico desses grãos, esta técnica de manejo pode impactar o meio ambiente, como também comprometer a simbiose entre planta e bactérias fixadoras de nitrogênio (GOMES *et al.*, 2021).

O manejo das sementes mediado a partir do tratamento químico necessita de conhecimentos básicos sobre as doenças que incidem nas lavouras do caupi, uma vez que a composição dependerá do patógeno alvo. Segundo Poltronieri *et al* (1994), o controle dos patógenos radiculares nas culturas incluem outras medidas de manejo de caráter preventivo além dos fungicidas já utilizados, dentre eles são: rotação de culturas, sementes saudáveis, aração profunda, utilização de cultivares resistentes, entre outros. Segundo o mesmo, no Pará em 1994, os métodos de controle recomendados para as sementes a base de compostos químicos frente a podridão cinzenta do caule causada por *Macrophomina phaseolina*, baseavam-se no uso de fungicidas à base de benomyl ou thiabendazol (2 g/kg de sementes), ou ainda com a mistura benomyl + thiram (2 g + 2 g do produto comercial (p.c) lkg de sementes). Tendo resultados mais promissores com a utilização benomyl, devido ao seu espectro de ação que controla o fungo tanto interna quanto externamente nas sementes.

Entretanto, atualmente, através das mutações a *Macrophomina phaseolina* tornou-se mais resistente aos compostos utilizados ao longo dos anos, que por conseguinte desencadeou uma difícil contenção do mesmo nas áreas de plantio, sendo necessário novas estratégias químicas. Há registros nos quais demonstram a

alternativas de manejo com a utilização fungicidas sistêmicos e não sistêmicos (carbendazim, difenoconazol, benomil, azoxistrobina, dazome) em diferentes concentrações resultando na sensibilidade do fungo. (MARQUEZ *et al.*,2021; LOKESH *et al.*,2020).

Obter sensibilidade das doenças dos solos, como por exemplo a murcha de *Fusarium* acometida pela espécie *F. oxysporum*, é uma tarefa difícil, não apenas em leguminosas, mas em todas as espécies de plantas, sendo necessário a integração de diferentes medidas de ação. Por ser considerado um fungo com uma alta transmissibilidade pelas sementes, o uso de sementes sadias e tratadas com a mistura dos fungicidas thiram + benomyl (2 g + 2 g do p.c/kg de sementes) é essencial para a proteção desses grãos. Além desses fungicidas, outros fumegantes como carbendazim, dazomet, cloropicrina e 1,3-dicloropropeno são comumente utilizados nas plantações de feijão frente a murcha, uma vez que apresentam eficiência contra doenças transmitidas pelo solo. Sendo eles caracterizados como compostos químicos alternativos e menos impactante a camada de ozônio como o brometo de metila (Poltronieri *et al.*.,1994; Sampaio *et al.*,2020).

Embora as medidas preventivas incluam uma diversidade de fungicidas em que visam a minimização dos prejuízos decorrentes da incidência dessas doenças, existem patógenos habitantes do solo, como por exemplo a *R. solani*, agente causal da mela em cultivo de feijão-caupi necessitam de um manejo integrado (adoção de várias práticas em conjunto), uma vez que de forma isolada através da pulverização de agentes químicos suas estruturas de resistências denominadas de escleródios permanecem no ambiente (Benchimol *et al.*, 2021; ABBAS *et al.*, 2019) que em condições favoráveis se desenvolverá ocasionando novos danos às lavouras de caupi.

2.3.1 CONTROLE QUÍMICO

Com os avanços tecnológicos e a necessidade de ascender a produtividade agrícola, bem como a erradicação da fome na década de 1950, originou-se a Revolução Verde em que consistiu na modernização e modificação radical das técnicas do sistema de produção agrícola em escala global (NODARI, 2018). Esses avanços, permitiu a inserção de uma grande variedade de substâncias sintéticas no meio ambiente. Dentre elas, destacam-se os agrotóxicos (inseticidas, fungicidas,

herbicidas, nematicidas e afins), no qual tem por finalidade agir na redução ou prevenção de pragas e doenças agrícolas (LINS *et al.*,2021)

Segundo a classificação realizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), os agrotóxicos são substâncias químicas e físicas que tem por objetivo alterar a composição química da flora, a fim de impedir proliferação de pragas, doenças ou ervas daninhas. Essas substâncias por sua vez possuem um baixo peso molecular, geralmente com baixa solubilidade em água e alta atividade biológica, que, por conseguinte acarreta um favorecimento no processo de produtividade rural. (MAY, 2021/ MAPA, 2019).

Entretanto, essa otimização nos cultivares agrícolas oriundo dos princípios ativos das moléculas de biocidas, inevitavelmente, apresentam elementos ou compostos potencialmente poluentes, como metais pesados, surfactantes, emulsificantes, entre outros. O acúmulo desses compostos especificamente os metais pesados sob altos níveis de concentração desencadeiam a uma toxicidade no estabelecimento e desenvolvimento das plantas. Além da sua presença excessiva favorecer o processo de degradação química no solo provocando assim efeitos adversos sobre os microrganismos local, alterando, conseqüentemente, a funcionalidade e perda da biodiversidade tal como a redução da fertilidade do solo (Steffen *et al.*, 2011; MONTALVÃO, 2016).

Logo, a intensa aplicação destes insumos nas áreas agrícolas convencionais implica em uma série de danos irreparáveis, uma vez que alguns constituintes dos agrotóxicos apresentam fatores nos quais não são biodegradáveis. Dessa maneira estes compostos acumulados no solo a base de cádmio, cromo, cobre, mercúrio e zinco, intensificam as externalidades negativas do seu uso, visto que integram o grupo de metais com maior risco de contaminação ambiental, resultando sérios problemas à saúde humana bem como a ocorrências de mutações genéticas como também a seleção de patógenos resistentes aos princípios ativos (LIMA *et al.*, 2000; MONTALVÃO, 2016).

2.3.2 CONTROLE BIOLÓGICO

Atualmente, o manejo de pragas e patógenos nas culturas agrônômicas está fundamentado no uso de compostos químicos. Entretanto, o uso excessivo e inadequado desses agrotóxicos na agricultura convencional implica em uma série de

danos irreparáveis ao meio ambiente, tal como a deterioração da saúde dos trabalhadores locais e dos consumidores, além de proporcionar o aceleração de resistência desses patógenos (LIMA et al., 2000; MONTALVÃO, 2016).

Devido às adversidades ocasionadas pelo o uso de agroquímicos, o interesse pela utilização de microrganismos endofíticos como ferramentas de biocontrole de fitopatógenos nos diferentes agroecossistemas tem aumentado em importância, devido a necessidades de buscar estratégias agrícolas eficientes e ambientalmente mais seguras ao uso das substâncias químicas e de seus efeitos negativos, como desequilíbrio ambiental, contaminação de água , solo, alimentos e impactos nas cadeias tróficas (SHIOMI et al., 2008; STEFFEN et al., 2011).

Segundo o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o controle biológico é definido como organismos vivos ou obtidos por manipulação genética, introduzidos no ambiente para controle de pragas e doenças provocados por inimigos naturais da agricultura. Os agentes biológicos de controle têm demonstrado uma grande aceitação nos últimos anos, sendo apontado como um método mais seguro para o manejo de doenças, visto que apresentam uma variedade de ações e vantagens que permitem atingir o seu alvo com bastante eficiência. Além disso, esses microrganismos possuem um perfil não degradante do meio ambiente e do solo, auxiliando o agricultor na permanência da sua área de cultivo (MELO, 2019).

Alguns Agentes de controle biológico (ACB) agem de forma direta, inibindo o crescimento do patógeno, enquanto outros impactam o patógeno indiretamente, desencadeando vias de defesa na planta hospedeira. A capacidade de ação empenhado pelos ACBs pode advir de vários mecanismos, que vão desde a competição com patógenos do solo por espaço e nutrientes, como também pela produção de substâncias deletérias aos microrganismos nocivos (MARQUEZ *et al.*, 2021).

Dados de alguns trabalhos evidenciam a superioridade da eficácia de bactérias com potencial de biocontrole isolados do solo, devido a diversidade microbiana presente no substrato (Baker *et al.*, 1983; Kobayashi et al., 1988; Omura *et al.*, 1988; Motomura *et al.*, 1996; Bluma & Etcheverry, 2006) Essa superioridade oriunda dos isolados do solo sustenta a teoria da competitividade em ambientes diversificados, uma vez que esse microrganismos crescem com baixas fontes de nutrientes e possuem um potencial antagônico aos organismos presente, fatores

essenciais para sua manutenção e desenvolvimento, demonstrando assim, sua alta competitividade.

2.4 *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* é constituído por bactérias em forma de bastonetes, gram-positivas, aeróbias obrigatórias ou facultativas e catalase positivas, que apresentam baixas necessidades nutricionais, o que propicia seu fácil cultivo em meios de cultura com baixo teor nutritivo (EINLOFT, 2016)

Dentre os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência, destaca-se o *Bacillus*, uma vez que são habitantes natural do solo e apresentam uma capacidade de formar endósporo resistentes a diversas condições ambientais e edáficas, possibilitando sua manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, além de apresentar uma versatilidade nos mecanismos antagônicos (LANNA, et al.,2010).

Bacillus spp. promove o biocontrole de doenças acometidas em culturas agrícolas pela sua produção e liberação de diversos tipos de metabólitos antifúngicos, como lipopeptídeos cíclicos das famílias da surfactina, iturina e fengicina (LANNA et al.,2010). Nos quais, a surfactina apresenta sua funcionalidade mediada pela capacidade antibacteriana, bem como sua sinalização da defesa vegetal e indução do priming imunológico, além de auxiliarem o crescimento bacteriano; as iturinas apresentam atividade antifúngica e auxiliam no crescimento bacteriano, em função de suas propriedades surfactantes; já a fengicina, possuem capacidade antifúngicas e funcionam como sinalizadoras de defesa vegetal sistêmica contra os agentes toxigenicos (EINLOFT, 2016; ONGENA & JACQUES, 2008).

Além de desempenharem a atividade antifúngica, esse gênero auxilia no crescimento de plantas, uma vez que são caracterizadas como RPCP (rizobactérias promotoras de crescimento em plantas), protegendo os vegetais de estresses bióticos e abióticos. Dentre os mecanismos antagônicos apresentados pelas rizobactérias, são retratados a: produção de sideróforos, indução de resistência, antibiose, produção de fitohormônios como o ácido indol-3-acético (IAA), enzimas hidrolíticas e compostos orgânicos voláteis (PEREIRA, 2021; ABBAS et al.,2019).

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. et al. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. **Comptes Rendus Biologies**, v. 342, n. 5-6, p. 124-135, 2019.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; SANTOS, ARB; DA SILVA, P. H. S. Fungos em sementes de feijão-caupi: detecção, qualidade sanitária e controle alternativo. **Embrapa Meio-Norte-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2020.

BAKER, C.J. et al. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 1148– 1152, 1983.

BELLÉ, R.; FONTANA, D. C. Patógenos de solo: principais doenças vasculares e radiculares e formas de controle. **Enciclopédia biosfera**, v. 15, n. 28, 2018.

BIANCHINI, A.; MARIGONI, A.C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G.; Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (ed.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.

BLUMA, R.V.; ETCHEVERRY, M.G. Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus section Flavi*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 242–251, 2006.

CARDOSO, J. E. Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo. **EMBRAPA-CNPAF. Documentos**, 1990.

CARVALHO, DC.et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 28-34, 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro 2021. Brasília: CONAB, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: Fev. 04, 2022.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento, setembro 2021. Brasília: CONAB, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: Maio. 04, 2022.

DA CRUZ, Derivaldo Pureza. **Adaptabilidade, estabilidade fenotípica e.; de feijão-caupi, desenvolvimento de linhagens..** 2021. Tese de doutorado

DA SILVA SOUZA, J.; MARTINS, A. F.; PEDROSA, L. M. Importância de bactérias fixadoras de nitrogênio no cultivo do feijão-caupi vigna unguiculata l.(walp. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 9, 2021.

DA SILVA, J. A. Macrophomina phaseolina em feijão-caupi: agressividade de isolados, métodos de inoculação e reação de germoplasmas tradicionais. 2021.

DE OLIVEIRA, I. J. et al. Recomendações técnicas para o cultivo de feijão-caupi no Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2019.

DEMARTELAERE, A. C.F.et al. Controle biológico da murcha de fusarium no feijão caupi. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 4798-4818, 2021.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Biology and pathology of Macrophomina phaseolina. 166 p. **Imprensa Universitaria da Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Mato Grosso, Brasil**, 1978.

EINLOFT, T. C.. Biocontrole de Aspergillus flavus e Fusarium verticillioides por Bacillus spp. isolados de plantas de milho. 2016.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (Phaseolus vulgaris L.) e caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2019): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2020. Disponível em:. Acesso em: 21 jan. 2021.

GARCÍA, A., ROMERO, D. & VICENTE, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinions in Biotechnology**, 22, 187–193

GOMES, D. P. et al. Inoculantes em Sementes de Leguminosas: relações com o tratamento químico. **Cadernos de Agroecologia**, v. 17, n. 2, 2021.

GOUVEIA, W. A.; NORONHA, M. de A.; ROCHA, M. de M. Resistência de genótipos de feijão-caupi a *Rhizoctonia solani*.

GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R.. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012.

KALIM, S.; LUTHRA, Y. P.; GANDHI, S. K. Cowpea root rot severity and metabolic changes in relation to manganese application. **Journal of Phytopathology**, v. 151, n. 2, p. 92-97, 2003.

KOBAYASHI, Y.; KO, K.; YAMAGUCHI, I. A new antibiotic, tautomycetin. *Journal of Antibiotics*, Tokio, v. 42, p. 141-144, 1988.

LIMA, L. H. C.; MARCO, JL de; FELIX, J. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. **Controle biológico**, v. 11, p. 263-304, 1998.

LINS, EDUARDO ANTONIO MAIA et al. Análise Dos Possíveis Impactos Ambientais Causados Por Agrotóxicos Em Plantio De Cana-De-Açúcar Na Cidade De Escada, Pernambuco. 2021

LOKESH R., RAKHOLIYA KB, THESIYA MR (2020). Avaliação de diferentes fungicidas contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid. causando podridão seca da raiz do grão de bico (*Cicer arietinum* L.) *in vitro*. *Ártico. Int. J. Curr. Microbiol. Aplic. Sci.* 9 1-11. 10.20546/ijcmas.2020.907

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Ministério publica novas especificações para registros de defensivos biológicos, 09 de setembro de 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-publica-novas-especificacoes-para-registro-de-defensivos-biologicos>>.

MARQUEZ, N. et al. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

- MAY, DANIELA CRISTINA. Impacto Dos Agrotóxicos Na Saúde Do Trabalhador Rural: Plantações De Tomate Através Da Agricultura Familiar. 2021.
- MELO, JORDANA ALVES DA SILVA. Trichoderma sp. E Bacillus sp. COMO BIOPROMOTORES DE CRESCIMENTO NO FEIJÃO-CAUPI. 2019.
- MONTALVÃO, SANDRO COELHO LINHARES. Uso de Bacillus spp. para o controle de Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum e Meloidogyne incognita no algodoeiro (Gossypium hirsutum). 2016.
- MOTOMURA, M. et al. Screening and isolation of anti-Fusarium moniliforme compounds producing microorganisms from soil and corn. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 213-217, 1996.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Doenças do Feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2006b. 7 p. (Embrapa Roraima. Circular técnica, 2).
- NODARI, Anderson Maykon. **Análise dos impactos do modelo Revolução Verde: Caso dos agricultores familiares do município de Medianeira, Paraná.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso.
- OMURA, S. et al. Phthoronycin, a new active against a plant pathogen, Phytophthora sp. **Journal of Antibiotics**, v. 41, p.1910–1912, 1988.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology, Cambridge**, v. 16, p. 115-125, 2008.
- PEREIRA, ALICE RAFAELA et al. Controle Biológico de Sclerotium cepivorum mediado por Bacillus spp. na cultura do Alho (Allium sativum). 2021.
- POLTRONIERI, L. S.; SILVA, J. F. de A. F.; OLIVEIRA, A. F. F. Controle de Macrophomina phaseolina através da cobertura morta do solo associada ao tratamento químico de sementes. Belém, PA: **Embrapa**, p. 5, 1992.
- POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; DA SILVA, JF de AF. Principais doenças do caupi (Vigna unguiculata (L) Walp) no Pará e recomendações de controle. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 1994.

SAMPAIO, A. M. et al. Manejo da murcha de fusarium em leguminosas. **Agronomia**, v. 10, n. 8, pág. 1073, 2020.

SHIOMI, H. F. et al. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SOBRINHO, C. A.; SANTOS, A. R. B.; DA SILVA, P. H. S. Fungos em sementes de feijão-caupi: detecção, qualidade sanitária e controle alternativo. Brasília, DF: **Embrapa** p. 53, 2020

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-lógica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

STEIN, T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 56, p. 845–857, 2005.

SZCZETCHURA, W. et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici – the cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. **Journal of Plant Protection Research** v.53, n.2, p. 172-178, 2013

VIEIRA JUNIOR, J. R. et al. Ocorrência da fusariose (*F. oxysporum* f. sp. tracheiphilum) em feijão-caupi (*V. unguiculata* L. Walp) em Rondônia. **Embrapa Rondônia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2010.

4. CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus* spp. FRENTE A PATÓGENOS RADICULARES

**Artigo a ser submetido ao
periódico Pesquisa Agropecuária
pernambucana**



ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus* spp. FRENTE A PATÓGENOS RADICULARES

Beatriz Rayana Damásio de Andrade^{1,2}, Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva², José de Paula Oliveira².

¹ Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Federal Rural de Pernambuco

²Instituto Agronômico de Pernambuco

RESUMO – A intensificação do uso de fungicidas em cultivos de feijão para manejo de doenças radiculares vem ocasionando grande contaminação e deterioração a saúde humana e ambiental, fazendo-se necessário a busca e desenvolvimento de ferramentas agroecológicas ambientalmente seguras. A introdução do gênero *Bacillus*, como alternativa ao controle biológico de fitopatógenos, vem aumento em importância, visto que possuem diversos mecanismo de ação com características antifúngicas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi obter agentes de controle biológico potencialmente eficientes com atividade antifúngica. Após o tratamento térmico submetido na amostragem proveniente de solos agrícolas sob vegetação de *Vigna unguiculata* foram isoladas 12 bactérias, das quais passaram por uma série de testes morfofisiológicos, bioquímicos e antagônico. Onde a morfologia bacteriana foi observada através da coloração de Gram, em que foi identificado a forma bacilar dos microrganismos, sendo posteriormente inoculadas em meios bioquímicos específicos para a seleção de bactérias que possuíssem similaridade a cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Após o processo seletivo, foi executado o teste de pareamento de culturas em placa de Petri, onde, especificamente, o isolado IPA 125 mostrou-se promissor para atividade antagônica demonstrando um capacidade reducional da taxa de crescimento micelial in vitro dos fungos *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *macrophomina phaseolina*, em $88,4 \pm 1,2$ °, $88,3 \pm 2,5$ ° e $53,9 \pm 3,1$ ° respectivamente. Com isso, conclui-se que o microrganismo IPA 125 possui características promissoras de interesse biotecnológico para controle de patógenos radiculares acometidos nas plantações de feijão-caupi.

Palavras-chaves: Controle biológico; Fungos patogênicos; Feijão- caupi

1. INTRODUÇÃO

Vigna unguiculata (L.) Walp, popularmente conhecido como feijão-caupi ou macassar, é uma leguminosa originária do continente africano, presente em lavouras de agricultura familiar nordestina. Por possuir alto valor nutritivo, com ciclo curto, baixa exigência hídrica e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade tornou-se uma das principais culturas de subsistência das regiões norte e nordeste do Brasil (SOUZA et al., 2021; ROCHA et al., 2017).

Entretanto, diversos fatores limitantes oneram a produção e qualidade do feijão caupi tais como agentes patogênicos, principalmente os fungos presentes nos solos, assim como os agentes abióticos: temperatura, radiação solar, vento, disponibilidade hídrica, entre outros (EMBRAPA, 2012; CARVALHO et al., 2011). Apesar de rústico, o sistema radicular do feijoeiro é muito suscetível a doenças, favorecendo a danos significativos, que podem chegar a 100% no rendimento agrícola. (ESTEFANI et al., 2007).

De acordo com Szczecmaioria hura et al. (2013), a perda causada por fitopatógenos equivale a bilhões de dólares por ano, tendo um dos principais agentes causais o *Fusarium* spp., *Rhizoctonia Solani* e *Macrophomina phaseolina*. Como consequência desses danos, agricultores vêm intensificando o uso de agroquímicos acarretando uma alta contaminação e deterioração do meio ambiente, além de proporcionar aos fungos condições necessárias para o desenvolvimento de resistências aos princípios ativos utilizados com maior frequência (PÉREZ et al., 2021; ANDRADE et al., 2021).

Em contrapartida, considerando como alternativas ambientalmente mais sustentáveis para controle de doenças, destaca-se a utilização de microrganismos como ferramenta de biocontrole, uma vez que sua capacidade antagônica pode advir de diversos mecanismos de ação, como a competição por espaço e nutrientes, síntese de substâncias deletérias aos fitopatógenos, indução a resistência sistêmica no hospedeiro, bem como a produção de substâncias promotoras de crescimento (SHIOMI et al., 2008; MANDAL et al., 2009).

Dentre os microrganismos com maior prevalência, destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus* encontradas no solo em razão da sua versatilidade nos mecanismos de ação, tal como sua capacidade de ascensão no rendimento de culturas, já que auxiliam no crescimento e sanidades de plantas (LANNA FILHO et al., 2010; SHIOMI et al., 2008; ABBAS et al., 2019). Segundo Lazzaretti & Melo (2005) a aplicação *B. subtilis* 0G, via sementes, em solo natural, chega a promover um aumento de mais de 100% da nodulação de raízes de feijoeiros,

resultando, portanto, aspectos promissores ao crescimento de feijão. Além da sua excelente habilidade de produzir metabólitos com atividade antifúngica.

Dessa forma, com o propósito de se obter agentes de controle biológico potencialmente eficientes com atividade antifúngica, o presente estudo objetivou selecionar e caracterizar bioquimicamente, fisiologicamente e morfológicamente isolados de *Bacillus* spp. com potencial antagonico frente aos fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *Rhizoctonia solani*.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostragem de Solo

As amostragens de solos de feijoeiro (*Vigna unguiculata*) foram coletadas em dois pontos aleatórios, com profundidade de 20cm, obtidas com pá de corte, no Município de Cedro, Sertão de Pernambuco. Na qual foram colocadas em sacos plásticos, identificadas como solo 1 e solo 2 e, posteriormente acondicionadas na estufa incubadora BOD no laboratório de biologia do solo do Instituto Agronômico de Pernambuco.

2.2 Isolamento de *Bacillus* spp. do solo

Para o isolamento de bactérias do gênero *Bacillus* das amostras de solo, 10 g de cada amostra de solo foram adicionados em frascos de Erlenmeyers contendo 90 ml de água destilada esterilizada e posteriormente foram mantidos em banho-maria a 80°C durante 20 minutos para estimular e selecionar as bactérias com capacidade de produzir esporos resistentes ao calor. Após o tratamento térmico, foram retiradas alíquotas de 1 ml para realizar diluições seriadas em água destilada esterilizada. Sendo, posteriormente, realizado o plaqueamento com 0,2 ml da última suspensão no meio de cultura ágar nutritivo, que com auxílio da alça de Drigalski foram espalhadas e incubados em estufa bacteriológica a 28°C até o crescimento das colônias (SANHUEZA; MELO, 2007).

2.2 Identificação bioquímica, morfológica e fisiológica dos isolados de *Bacillus*

Foi realizada a identificação e caracterização dos isolados do gênero *Bacillus*, quanto à similaridade morfofisiológica e bioquímica comparada a cepa padrão *B. subtilis* (ATCC 6633), cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Após a recuperação em meio TSB (ágar tripton de soja) foram realizados, juntamente com os isolados, uma série de testes bioquímicos, nos quais foram analisadas a produção das enzimas oxidase e catalase, além dos testes de motilidade, coloração de Gram e Indol. Para a

identificação morfológica, realizou-se a análise macromorfológica das colônias formadas em placa de Petri, observando-se a forma (puntiforme, circular e irregular) e transparência (opaca, transparente e translúcido). Além do teste qualitativo de temperatura (RABINOVITCH E OLVEIRA,2015; GOVEIA,2018).

2.3 Antagonismo de *Bacillus* a *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *Rhizoctonia solani* Kuhn

Para avaliação do efeito antagônico, foi utilizado 7 cepas isoladas do solo e a cepa padrão (*B. Subtilis* ATCC 6633) no crescimento dos fitopatógenos através do método de pareamento de culturas em placa de Petri, de acordo com Dennis e Webster (1971) com adaptações. Os isolados foram inoculados no meio luria bertani (LB) e acondicionadas em incubador rotativo (150 rpm/minuto) sob temperatura de 28°C por 24 horas. Posteriormente, foram suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,9%) para obtenção de aproximadamente 10⁶ UFC/ml dos microrganismos (de acordo com a escala de turbidez McFarland). Para tanto, os fitopatógenos *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *Rhizoctonia solani* obtidos da coleção do germoplasma de microrganismos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), foram replicados em placas contendo o meio Sabouraud, e em seguida mantidos em temperatura ambiente durante 9 dias. Discos de ágar (0,5cm de diâmetro)contendo estrutura fúngica retirados da cultura pura foram depositados na região central da placa de Petri com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) + LB e o antagonista foi aplicado em quatro pontos distintos na placa em alíquota de 10 µl cada, de modo que ficassem equidistantes.Após montagem dos ensaios, as placas foram vedadas e acondicionadas em estufa de crescimento microbiológico sob temperatura de 28°C. Como controle, os fitopatógenos foram cultivados isoladamente em meio (BDA+LB), por meio da transferência de discos de ágar e mantidas na mesma condição dos ensaios (MONTALVÃO,2016). As avaliações foram mediadas a partir da comparação da medição do crescimento fúngico entre a placa de ensaio e a placa testemunha, a partir do cálculo de percentagem de inibição do crescimento micelial:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{raio do controle} - \text{raio do tratamento})}{\text{Raio do controle}} \times 100$$

Raio do controle

2.4 Curva de Crescimento do Isolado- IPA 125

A análise do crescimento bacteriano foi feita em biorreator de tanque agitado modelo BIO-TEC-PRO da marca Tecnal, onde a dorna foi preenchida com 5L do meio de cultura LB,

esterilizado em autoclave a 121°C por 40 minutos. Esse meio de cultura foi inoculado com 5% da cultura de pré-inoculação e o processo fermentativo foi mantido a 28°C, com velocidade de agitação constante de 200 rpm e fluxo de aeração constante a 5 lpm. Após 72h, a fermentação foi encerrada. (VU et al., 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação bioquímica, morfológica e fisiológica dos isolados de *Bacillus*

Após o tratamento térmico submetido na amostragem proveniente de solos agrícolas e sob vegetação de *Vigna unguiculata*, foram selecionados 12 isolados bacterianos codificados como (IPA-124, IPA-125, IPA-126, IPA-131, IPA-132, IPA-133, IPA-221, IPA-222, IPA 233, IPA 234, IPA-235, IPA-236.). Esse tratamento térmico possibilitou a seleção de *Bacillus* spp., inibindo o crescimento de espécies contaminantes, além auxiliar na triagem de bactérias com a capacidade de formar endósporos (Gonçalves *et al.*, 2017).

Todas as cepas isoladas passaram por testes de identificação morfológica, fisiológica e bioquímica, que serviram para caracterizá-las e avaliá-las como possíveis agentes antifúngicos. As colônias apresentaram variações morfológicas, sendo selecionadas apenas as que se assemelhavam mais à espécie *B. subtilis*. Todos os isolados bacterianos possuem um crescimento rápido em estufa a 28°C com menos de 24h de incubação. No qual, dez dessas amostras, exceto IPA-126 e IPA-234, possuíam a capacidade de reter o corante cristal violeta devido à presença de sua espessa camada de peptidoglicano em suas paredes celulares sendo, assim, classificadas como bactérias Gram-positivas (Tabela-1).

Tabela 1. Identificação morfológica, fisiológica e bioquímica dos isolados do solo.

Isolados de <i>Bacillus</i> spp.	GRA	COR	FOR	TRS	FP	CA	MO	IN	OX	TCR	Selecionados para teste antagônico
IPA-124	GP	BR	BA	OP	CL	P	P	N	P	<24h	+
IPA-125	GP	BR	BA	OP	IR	P	P	N	P	<24h	+
IPA-126	GN	BR	OF	OP	CL	N	N	N	N	<24h	-
IPA-131	GP	BR	BA	OP	IR	P	P	N	P	<24h	+
IPA-132	GP	BR	OF	OP	CL	P	P	N	N	<24h	-
IPA-133	GP	BR	BA	OP	IR	P	P	N	P	<24h	+
IPA-221	GP	BR	BA	OP	CL	P	P	N	P	<24h	+
IPA-222	GP	BR	BA	OP	CL	P	P	N	P	<24h	+
IPA-223	GP	BR	BA	OP	CL	P	P	N	P	<24h	+
IPA-234	GN	BR	OF	OP	CL	P	P	N	N	<24h	-
IPA-235	GP	BR	OF	OP	CL	N	P	N	N	<24h	-
IPA-236	GP	BR	OF	OP	CL	P	P	N	N	<24h	-

GRA: Gram (GP – Gram positiva, GN – Gram negativa); COR : cor da colônia (BR- branca); FOR (OF- outra forma; BA – Bastonetes); TRS : transparência (OP- opaco); FP : Forma da

colônia em placa (CL – circular, IR – irregular); CA (P- catalase positiva, N catalase negativa); MO (P- Motilidade positiva, N- Motilidade negativa); IN(N- Indol negativo); OX (P- oxidase positiva, N – oxidase negativa); TCR (tempo de crescimento).

As provas bioquímicas e fisiológicas mostram que os isolados foram negativados para o indol, mas, em sua maioria, positivados para a motilidade. Ademais, a leitura para a identificação da presença da enzima catalase nos *Bacillus* spp., através do teste com peróxido de hidrogênio (3%) resultou em dez microrganismos catalase-positiva (Tabela1). A presença dessa enzima nesses microrganismos permite a proteção contra danos oxidativos por espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que converte o composto tóxico (peróxido) em água, favorecendo, assim, o sistema de defesa bacteriano e, dessa forma, podendo ser considerado como um mecanismo de proteção (MBAI *et al.*,2013).

Assim como a catalase a enzima oxidase, também conhecida como SOD (superóxido dismutase), auxilia na proteção contra a toxicidade celular, apresentando variações entre as espécies do gênero *Bacillus* segundo a literatura. O teste de oxidase submetido nas cepas isoladas resultou em sua maioria de forma positiva, como evidenciado na Tabela 1. Por fim, foi verificado que as cepas foram capazes de resistir a 50°C em estufa bacteriológica, cessando seu crescimento em temperaturas superiores (55-60°C). A partir desses resultados, foram selecionados sete isolados para o teste de antagonismo, devido suas características apresentadas como a coloração de gram positiva, indol negativo, catalase positiva, oxidase positiva, motilidade positiva e sua morfologia celular do tipo bastonete, conforme a tabela 1 (RABINOVITCH *et al.*, 2015; GOVEIA, 2018).

3.2 Antagonismo de *Bacillus* a *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* s. *fp. tracheiphilum* e *Rhizoctonia solani* Kuhn

No experimento *in vitro* observou-se que os sete isolados testados mais a cepa padrão de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) apresentaram atividades antagônicas diversificadas frente a *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* s *fp tracheiphilumi*, onde apenas o isolado IPA 125 resultou em atividade antagônica, inibindo o crescimento micelial da colônia fúngica dos fungos *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* s *fp tracheiphilumi* em $88,4 \pm 1,2^a$, $53,9 \pm 3,1^b$, $88,3 \pm 2,5^a$ respectivamente. Apresentando assim uma eficiência inibitória superior ao controle, já que o mesmo conteve o crescimento micelial apenas do fungo *Macrophomina phaseolina* em $20,6 \pm 1,2^c$, conforme a Tabela 2, a seguir:

Tabela 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos patógenos radiculares de feijão-caupi sob ação do *B.subtilis* (ATCC 6633) e isolado IPA 125.

Fungos	Bactérias	Inibição
<i>Macrophomina phaseolina</i>	IPA125	53,9 ± 3,1 ^b
	BS6633	20,6 ± 1,2 ^c
<i>Rhizoctonia solani Kuhn</i>	IPA125	88,4 ± 1,2 ^a
	BS6633	0,0 ^d
<i>Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum</i>	IPA125	88,3 ± 2,5 ^a
	BS6633	0,0 ^d

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Esses resultados demonstraram a possibilidade da obtenção do antagonista capaz de limitar o crescimento micelial dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum s fp tracheiphilumi* em testes *in vitro* (figura 1). Elucidando os mecanismos de ação da interação entre antagonista-patógeno-hospedeiro já relatados também por Silva (2020). Segundo seus dados, os isolados de *Bacillus subtilis* submetidos a testes antagônicos, promoveram diferenças significativas nos tratamentos. Apresentando crescimento micelial do patógeno de 80,16 mm e 80,76 mm, com 10,93% e 10,26% de inibição de *M. phaseolina* em relação ao tratamento controle contendo o crescimento micelial total de 90,00 mm. Além da sua promoção de 27,06%, de aumento no crescimento das raízes das plantas e sua ação reducional da severidade da doença em condições de casa de vegetação.

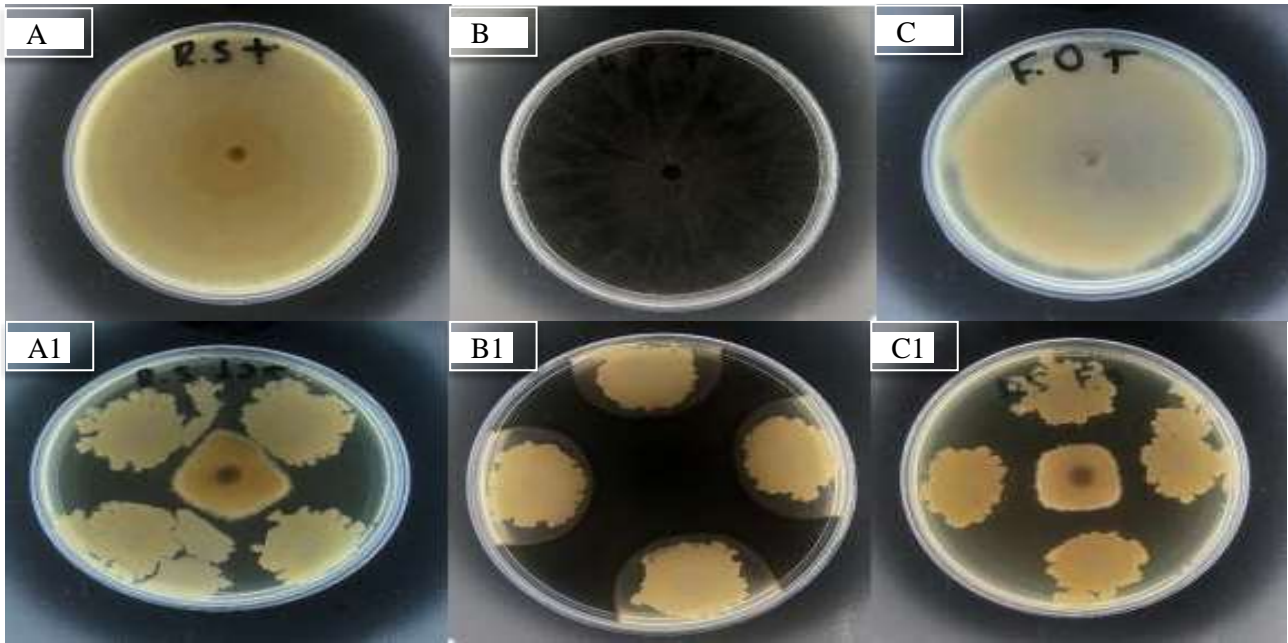


Figura 1- Atividade antagonística *in vitro* do isolado IPA 125 frente aos patógenos *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum sfp tracheiphilumi*, respectivamente. (A) Placa teste de *Rhizoctonia solani*, (A1) inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, (B) placa teste de *Macrophomina phaseolina*, (B1) inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, (C) placa teste de *Fusarium oxysporum sfp tracheiphilumi*, (C1) Inibição do crescimento micelial do *Fusarium oxysporum sfp tracheiphilumi*

Segundo Einloft (2016) essa habilidade antagonística apresentada pelo gênero *Bacillus* está principalmente associada à síntese de diversos metabólitos antimicrobianos. Destacando-se, em função do seu potencial biotecnológico, os lipopeptídeos cíclicos, sufactinas, fengicinas e as iturinas. Que por sua vez, em virtude de sua estrutura química, são capazes de se ligar à membrana celular fúngica e formar poros, levando a um extravasamento citoplasmático e por conseguinte, a morte celular, caracterizando a atividade antifúngica (BONMATIN *et al.* 2003).

Resultados semelhantes relatados por De Sá *et al.* (2019), descreveram que diferentes cepas, a exemplos *Bacillus sp.* (BMH), *Bacillus subtilis* (LCB 30) e *Bacillus sp.* (INV), através de antibiose, apresentaram um amplo espectro de ação reduzindo o crescimento micelial de *Fusarium sp.* em 4,8; 3,6; 4,8; cm respectivamente. Essa diferença competitiva apresentada pelo gênero, ou até mesmo pela mesma espécie, pode ser compreendida pela sua adaptabilidade, eficácia e sobrevivência a diversidade microbiana adversas presente no substrato de origem, resultando em habilidades antagonísticas únicas a cada microrganismo (BLUMA & ETCHEVERRY, 2006).

3.3 Curva de Crescimento do Isolado- IPA 125

Uma fermentação piloto foi realizada para determinar a curva de crescimento de *Bacillus* sp. IPA 125. De acordo com a figura 2, inicialmente o isolado ficou na fase *lag* durante 4-5 horas, seguindo de um estacionamento do crescimento celular por aproximadamente 7 horas. Esse estacionamento pode ter sido devido a limitação de oxigênio, onde, nesse momento, atingiu uma saturação limitada de 10% (MOUNSEF *et al.*, 2006). Após a saturação de oxigênio ter se reestabelecido atingindo 115%, o isolado IPA 125 cresceu exponencialmente e atingiu seu máximo crescimento celular em 52 horas, seguido pela fase estacionária.

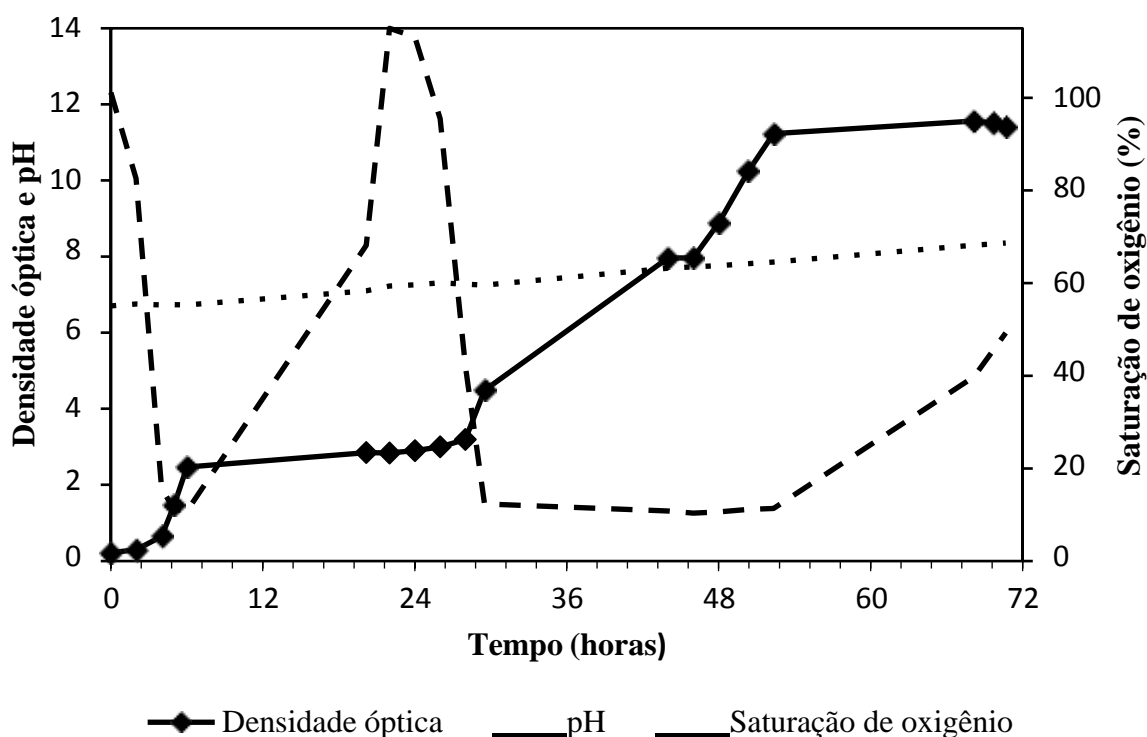


Figura 2 - Crescimento celular, consumo de oxigênio e pH durante a fermentação do isolado *Bacillus* sp. IPA 125

Durante a fase de crescimento exponencial do isolado, a oxigenação também atingiu um nível crítico, podendo ter levemente inibido seu crescimento celular. Adazami *et al.* (2018) reporta que o gênero *Bacillus* é estritamente aeróbico e a oxigenação tem um grande papel regulatório do seu crescimento; então, portanto, provavelmente as condições de oxigenação para cultivo do presente isolado devam ser mais elevadas para permitir um crescimento celular adequado. Ademais, o pH aumentou durante o processo fermentativo, atingindo 8,3. Esse aumento indica o início do processo de esporulação de bactérias do gênero *Bacillus* (GAUVRY *et al.*, 2021).

4. CONCLUSÃO

Os resultados observados *in vitro* revelaram que os 7 isolados selecionados para o teste antagônico são possíveis bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, onde, especificamente, o IPA 125, apresentou elevada atividade antifúngica para *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum s fp tracheiphilum* e *Macrophomina phaseolina* com inibição do crescimento micelial em $88,4 \pm 1,2$, $88,3 \pm 2,5$ e $53,9 \pm 3,1$, respectivamente. Sendo, portanto, um promissor microrganismo de interesse biotecnológico para produção de biofungicidas para uso no feijão-caupi. A análise do crescimento microbiano do isolado IPA 125 indicou que sua fermentação demanda uma alta necessidade de oxigênio, sendo as condições de cultivo usadas nesse estudo limitantes para sua fermentação.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; KHAN, S. U.; KHAN, W. U.; SALEH, T. A.; KHAN, M. H. U.; ULLAH, S.; ALI, A.; IKRAM, M. Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides, **Comptes Rendus Biologies**, v. 342, p. 124-135, 2019.
- ADZAMI, N. S. et al. A new potential of calcium carbonate production induced by *Bacillus sphaericus* in batch fermentation. **Int. J. Integr. Eng.**, v. 10, p. 43-47, 2018.
- BLUMA, R.V.; ETCHEVERRY, M.G. Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus section Flavi*. **Pest Management Science**, v. 62, p. 242–251, 2006.
- BONMATIN, J.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 6, n. 6, p. 541-556, 2003.
- BONMATIN, J.M., LAPRÉVOTE, O., PEYPOUX, F., 2003. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Comb. Chem. High Throughput Screen.** 6, 541–556
- Da SILVA, N. P. Biocontrole de *macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento na cultura do girassol com o uso de *trichoderma* sp. E rizobactérias. 2020. Trabalho de conclusão de curso.

- DE SÁ, M. N. F. et al.; Seleção *in vitro* de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium* sp. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 1, p. 14-16, 2019.
- DENNIS, C.; WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v.57, p.363-369. 1971.
- EINLOFT, T. C. Biocontrole de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* por *Bacillus* spp. isolados de plantas de milho. 2016.
- GAUVRY, E. et al. Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 108915, 2021.
- GONÇALVES O. S. *et al.* Prospecção de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole contra *Fusarium* sp. **Revista Mirante**, Anápolis, v. 10, n. 1, jun. 2017. ISSN 19814089 132.
- GOUVEIA, K.C. **Seleção e Avaliação de bactérias do gênero *Bacillus* com potencial probiótico para uso na carcinicultura**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) - Centro de biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.
- MBAI, F. N. et al. Morphological and biochemical characterisation of bacterial root endophytic isolates with potential to enhance plant growth from kenyan (mwea) basmati rice. In: **Scientific Conference Proceedings**. 2013.
- MONTALVÃO, S. C. L. Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). 2016.
- MOUNSEF, Jihane Rahbani et al. The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient K_La , on the fermentation kinetics of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. **Journal of biotechnology**, v. 210, p. 100-106, 2015.
- RABINOVITCH, L.; DE OLIVEIRA, E. J. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos. **CEP**, v. 21040, p. 900, 2015.