

EFICIÊNCIA DE *Bacillus* spp., NO BIOCONTROLE IN VITRO DE *Macrophomina phaseolina* E PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL

Francisca Elisângela Maniçoba¹, Hailton da Silva², Andréia Mitsa Paiva Negreiros³, Naama Jéssica de Assis Melo⁴ Rui Sales Júnior⁵

¹Pós-Graduação em Fitotecnia/PPGF – UFERSA, Mossoró/RN, Brasil,
elisangela.mani@outlook.com

RESUMO

Bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente encontradas no solo, sendo conhecidas como rizobactérias, pois promovem o crescimento de plantas e atuam como agentes de biocontrole contra fitopatógenos. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o potencial antagonístico in vitro de dois isolados de *Bacillus* contra a *Macrophomina phaseolina*, bem como a patogenicidade destes isolados para o meloeiro e a promoção de crescimento vegetal nesta cultura. O teste de antagonismo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (2 tempos de crescimento de *M. phaseolina* - 0 e 2 dias, 2 isolados bacterianos - F Rosa e F Branco e testemunha absoluta) e cinco repetições. Após cinco dias, foi medido o diâmetro do micélio do patógeno. O teste de patogenicidade e a avaliação de crescimento vegetal foram realizados em mudas de meloeiro amarelo através do método de imersão das raízes das plântulas em suspensões bacterianas e pelo método de injeção e aspersão. As avaliações foram realizadas 20 dias após o transplântio das plântulas para os vasos. Os resultados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os isolados de *Bacillus* apresentaram melhor atividade antagonística quando a inoculação foi feita no tempo zero de crescimento da *M. phaseolina* com 63,20% e 77,40% de inibição do crescimento micelial do patógeno pelos isolados F Rosa e F Branco, respectivamente. Os isolados bacterianos não foram patogênicos às plantas de meloeiro. A promoção de crescimento vegetal na cultura do meloeiro evidenciou-se apenas na parte radicular, onde o isolado F Rosa se destacou no aumento do comprimento das raízes apresentando uma média de 38,1 cm e o isolado F Branco se destacou no aumento do peso das raízes com média de 36,3 g.

Palavras-chave: Antagonismo. Bactérias. Controle biológico. Patógenos de solo.

INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* pertence à família Bacillaceae e compreende um grupo heterogêneo de bactérias com diversas características fisiológicas e genéticas (RABINOVITCH e VIVONI, 2016). Em geral, são bactérias Gram-positivas, se apresentando na forma de bastão ou bastonete e podem ser aeróbias obrigatórias ou facultativas. A característica mais marcante do gênero é a capacidade de produzir esporos, conferindo a estas bactérias uma fase altamente resistente contra um ambiente adverso (MADIGAN et al., 2016).

A maior parte das espécies de *Bacillus* tem o solo como habitat principal e são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), sendo

encontradas na rizosfera em associação ou não com as raízes, e ainda são capazes de potencializar o crescimento de plantas através de mecanismos diretos e indiretos (MOREIRA E ARAÚJO, 2013).

As rizobactérias do gênero *Bacillus* promovem o crescimento de plantas através de mecanismos diretos ligados ao fornecimento de nutrientes, como assimilação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e hormônios de crescimento (FERREIRA, 2018). Além disso, também podem ser utilizadas indiretamente como agentes de controle biológico de fungos fitopatógenos habitantes de solos ou da parte aérea de plantas (DORIGHELLO, 2017; MENDES JÚNIOR, 2020). A capacidade de atuação como agentes de biocontrole é devido à produção de metabólitos secundários que possuem atividade antimicrobiana e antifúngica contra microrganismos fitopatogênicos (VIEIRA JÚNIOR et al., 2013).

Considerando a importância de bactérias do gênero *Bacillus* para o setor agrícola, o trabalho teve como objetivo determinar o potencial antagonico in vitro de dois isolados de *Bacillus* contra a *Macrophomina phaseolina*, bem como a patogenicidade destes isolados em meloeiro e a promoção de crescimento vegetal nesta cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia II da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte. Foram utilizados dois isolados de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (F. Rosa e F. branco), isolados da rizosfera do meloeiro (*Cucumis melo* L). Os isolados foram cultivados em meio sólido nutriente-água (NA) e incubados a temperatura de 35°C, sendo utilizados com 24h de crescimento.

O efeito antagonico dos isolados bacterianos foi avaliado no crescimento micelial in vitro da *Macrophomina phaseolina* através do método de culturas pareadas (CORRÊA et al., 2007) com modificações. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2+1, correspondendo a 2 tempos de crescimento de *M. phaseolina* (0 dia e 2 dias), 2 isolados bacterianos (F. Rosa e F. Branco), acrescido de uma testemunha (somente *M. phaseolina*), totalizando cinco tratamentos com cinco repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri, preenchida com meio de cultura BDA (batata-dextrose-água). Com o auxílio de uma alça de platina, foram feitas quatro estrias em sentidos opostos na mesma placa com os isolados bacterianos provenientes de cultura pura, a 1,5 cm da borda. Em seguida, um disco de micélio de 0,6 cm de diâmetro do isolado fúngico retirado de cultura pura foi colocado no centro da placa. A inoculação dos isolados bacterianos nas placas foi feita em dois tempos, no tempo zero dia (0) e de dois (2) dias de crescimento de *M. phaseolina*. Para a testemunha, transferiu-se para o centro das placas de Petri um disco de 0,6 cm de diâmetro de *M. phaseolina*.

Após cinco dias de incubação à 30°C em estufa tipo B.O.D. no escuro, foi feito a avaliação medindo-se o diâmetro do micélio do patógeno com o auxílio de uma régua milimetrada. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi aplicada a fórmula: % inibição = $[(crtest - crtrat)/crtest] \times 100$, onde: crtest = crescimento radial testemunha; crtrat= crescimento radial tratamento.

O teste de patogenicidade e a avaliação de crescimento vegetal foram realizados em mudas de meloeiro amarelo. O delineamento experimental utilizado neste experimento foi o

inteiramente casualizado em esquema fatorial $2 \times 2 + 1$, correspondendo a 2 métodos de inoculação (injeção e suspensão), 2 isolados bacterianos (F. Rosa e F. Branco), acrescido de uma testemunha para cada bactéria. Totalizando assim, cinco tratamentos com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso de 500 mL. O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira, todas as raízes das plântulas de meloeiro foram imersas nas suspensões bacterianas ($A_{550}=0,25$ a $0,3$) preparadas com solução salina (NaCl 0,85%) por 1 minuto e, após isso, foram levadas para casa de vegetação. No caso da testemunha, as raízes das plântulas foram imersas em solução salina sem bactéria.

Após 15 dias em casa de vegetação, foi realizada a segunda etapa, inoculação das plantas pelo método de injeção e aspersão. Na inoculação por injeção foi injetada com uma seringa hipodérmica suspensões bacterianas no hipocótilo das mudas de meloeiro, enquanto na inoculação por aspersão, as folhas verdadeiras da cultura foram pulverizadas também com suspensões bacterianas. A avaliação foi realizada 20 dias após o transplântio das plântulas para os vasos; para o teste de patogenicidade foi observado se havia presença de sintomas típicos de doenças bacterianas nas plantas e para avaliação da promoção de crescimento vegetal foi medido o comprimento e peso fresco da parte aérea e parte radicular.

Os resultados de todos os experimentos foram submetidos à análise de variância e em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito antagônico dos isolados bacterianos avaliado no crescimento de *M. phaseolina* está apresentado na Tabela 1. De acordo com os resultados obtidos, os isolados de *Bacillus* apresentaram diferenças quanto à inibição de crescimento micelial, apresentando melhor atividade antagônica quando a inoculação foi feita no tempo zero de crescimento do fitopatógeno com porcentagem de inibição (PIC) variando entre 63,20% e 77,40% para F Rosa e F Branco, respectivamente. Esses valores vão de encontro aos resultados de Vieira et al (2016), que relataram que o isolado *Bacillus subtilis* BSV-05 inibiu em 61,43% o crescimento micelial de *M. phaseolina*.

De acordo com Chen et al (2008), a espécie *Bacillus subtilis* é capaz de produzir metabólitos voláteis que possuem atividade antifúngica, a produção dessas substâncias por espécies desse gênero pode ser um dos fatores que contribuíram para os resultados de inibição do crescimento micelial da *M. phaseolina* pelos isolados de *Bacillus* neste trabalho. Os metabólitos voláteis são de grande importância para o biocontrolador, pois esse tipo de metabólito se propaga melhor no solo do que os metabólitos não voláteis, desempenhando um papel fundamental para o controle do fitopatógeno (MARRONI E GERMANI, 2011).

Com relação à porcentagem de inibição do crescimento da *M. phaseolina* com a inoculação dos isolados bacterianos no tempo de 2 dias de crescimento do fungo, o isolado F. Rosa inibiu em 37,20% e o isolado F. Branco em 42,00%. Estes resultados inferem que pode haver um decréscimo no potencial antagônico destes isolados quando a inoculação acontecer após o estabelecimento do patógeno no meio. Mesmo assim, estes isolados indicam um possível potencial como agente de controle biológico, tendo em vista que alguns trabalhos relatam potencial de antagonistas com porcentagens de inibição de 40% ou mais do crescimento micelial do patógeno (LANNA FILHO et al., 2010).

Tabela 1- Porcentagem de inibição do crescimento (PIC) da *Macrophomina phaseolina* pelos isolados de *Bacillus* F Rosa e F Branco.

Teste de Antagonismo		
Tratamentos		PIC (%)
Testemunha		0.00 d
<i>M. phaseolina</i> 0 dia	F Rosa	63.20 b
	F Branco	77.40 a
<i>M. phaseolina</i> 2 dias	F Rosa	37.20 c
	F Branco	42.00 c
C.V. (%)		13.88

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. C.V.= coeficiente de variação.

O teste de patogenicidade dos isolados bacterianos em mudas de meloeiro está apresentado na tabela 2. As plantas de meloeiro inoculadas com os isolados de *Bacillus* F. Rosa e F. Branco não apresentaram sintomas típicos de doenças bacterianas. De acordo com a literatura, em sua grande maioria, bactérias do gênero *Bacillus* não são patogênicas (RABINOVITCH e VIVONI, 2016).

A promoção de crescimento pelos isolados bacterianos na cultura do meloeiro está apresentado na Tabela 2. O tratamento com o isolado F. Rosa pelo método de inoculação por injeção se diferiu estatisticamente da testemunha, apresentando aumento no comprimento das raízes com uma média de 38,1 cm. Com relação ao tratamento com o isolado F. Branco, mediante o método de inoculação por injeção, se diferiu estatisticamente de todos os tratamentos e promoveu aumento no peso das raízes com uma média de 36,3 g. Para as variáveis da parte aérea, nenhum dos tratamentos utilizados diferiu estatisticamente do tratamento controle, constatando que não houve diferença no crescimento da parte aérea das plantas.

Sendo assim, a promoção de crescimento vegetal pelos isolados de *Bacillus* neste estudo evidenciou-se apenas na parte radicular da cultura do meloeiro. O aumento de crescimento nesta parte está relacionado à sanidade da planta proporcionada por estes microrganismos, uma vez que microrganismos associados às raízes ou rizosfera de plantas tendem beneficiá-las a ter uma maior absorção de nutrientes em condições adversas (CHAGAS et al., 2017). Sousa et al (2019), estudando RPCPs em plântulas de dois cultivares de arroz irrigado por inundação, verificaram que duas espécies de *Bacillus* sp., promoveram um incremento médio de 24,3% e 31% no comprimento de raízes dessa cultura. Estes resultados podem ser explicados por Beneduzi et al (2008), que estudando um isolado do gênero *Bacillus* através de testes laboratoriais verificaram que este microrganismo produz uma alta taxa de produção do fitohormônio ácido indolacético (AIA) que auxilia na formação do sistema radicular, além disso, atua como produtor de sideróforos e fixador de nitrogênio.

Tabela 2- Teste de patogenicidade e avaliação de crescimento vegetal dos isolados de *Bacillus* F. Rosa e F. Branco em mudas de Meloeiro.

Tratamentos			Meloeiro (<i>Cucumis melo</i> L)			
			Patogenicidade	CPA	PPA	CR
Testemunha		-	20,0 a	19,3 a	25,3 b	16,7 b
Injeção	F Rosa	-	19,2 a	18,9 a	38,1 a	20,2 b
	F Branco	-	20,6 a	18,5 a	29,8 ab	36,3 a
Suspensão	F Rosa	-	17,2 a	14,7 a	28,0 ab	15,2 b
	F Branco	-	22,3 a	18,7 a	26,4 ab	19,4 b
C.V. (%)			25,4	24,5	21,2	27,1

- = ausência de sintomas bacterianos

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

CPA = Comprimento da parte aérea (cm). PPA = Peso da parte aérea (g). CR = Comprimento das raízes (cm) PR = Peso das raízes (g).

CONCLUSÕES

Os dois isolados de *Bacillus* demonstraram um potencial antagônico contra *M. phaseolina*, na qual o isolado F Rosa e F Branco inibiu 63,20% e 77,40% o crescimento micelial do fitopatógeno, respectivamente.

Os isolados bacterianos F Rosa e F Branco não foram patogênicos às plantas de meloeiro.

A promoção de crescimento vegetal pelos isolados de *Bacillus* na cultura do meloeiro evidenciou-se apenas na parte radicular, onde o isolado F Rosa se destacou no aumento do comprimento das raízes apresentando uma média de 38,1 cm e o isolado F Branco se destacou no aumento do peso das raízes com média de 36,3 g.

REFERÊNCIAS

BENEDUZI, A. *et al.* Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, 39(3):311-320, 2008.

CHAGAS, L. F. B. *et al.* *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* sp. no incremento da biomassa em plantas de soja, feijão-caupi, milho e arroz. **Agri-environmental sciences**, v. 3, n. 2, p. 10-18, 2017.

CHEN, H. *et al.* Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919–923, 2008.

CORRÊA, S.; MELLO, M.; AVILA, Z. R.; BRAUNA, L. M.; PADUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, v. 11, n. 1, 2007.

DORIGHELLO, D. V. **Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**. 2017. 135p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de ciências agronômicas, Botucatu, 2017.

FERREIRA, T. ***Bacillus* spp. como agentes de controle de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium verticillioides* e promotores de crescimento de cana-de-açúcar e milho**. 2018. 87p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2018.

LANNA FILHO, R. *et al.* Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. **Microbiologia de Brock**, 14° ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960 p.

MARRONI, I. V.; GERMANI, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, p. 159-167, 2011.

MENDES JÚNIOR, J. P. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a videiras no Vale do São Francisco**. 2020. 83p. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.

MOREIRA, A. L. de L.; ARAÚJO, F. F. de. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

RABINOVITCH, L.; VIVONI, A. M. *Bacillus* e o *Bacillus cereus* com suas facetas como bactérias esporuladas Gram-positivas. **Ciências Farmacêuticas**, p. 3, mai/jun. 2016.

SOUSA, I M. *et al.* Bactérias promotoras do crescimento radicular em plântulas de dois cultivares de arroz irrigado por inundação. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2019.

VIEIRA, B. S. *et al.* Potencial antagonístico de *Bacillus subtilis* (BSV-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 14, n. 1, p. 59-66, 2016.

VIEIRA JUNIOR, J. R. *et al.* Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, Porto Velho, 2013. 15p.