

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 10 (2)

April 2017

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=432&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Bioprospecção de isolados bacterianos para o controle biológico do mofo branco na soja

## Bioprospecting bacterial strains for biological control of white mold on soybean

H. F. Shiomi<sup>1\*</sup>, M. V. R. Ferreira<sup>2</sup>, I. S. Melo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, UFMT/CUS, Sinop, MT, Brasil

<sup>2</sup>Engenheiro Florestal, Sinop, MT, Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil

\*Author for correspondence: [hfshiomi@yahoo.com.br](mailto:hfshiomi@yahoo.com.br)

**Resumo** - A busca por agentes de biocontrole de doenças eficientes na agricultura tem sido alcançada em diversos patossistemas. Nesse trabalho realizou-se experimentos sob condições controladas em laboratório e em casa-de-vegetação, envolvendo o uso das bactérias *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus cereus* GC subgrupo B, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia bercovieri* e *Photorhabdus luminescens-luminescens*, provenientes de biofertilizantes à base de esterco bovino e suíno. Os isolados bacterianos foram multiplicados em meio nutriente-ágar (NA) por 48 horas e avaliados quanto à sua eficácia no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* em testes de antagonismo em placas de Petri contendo meio BDA; ou em suspensão aquosa, ajustada em  $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>, com o auxílio da escala de Mc Farland, para a microbiolização de sementes e para a pulverização da parte aérea de plantas de soja em vasos, totalizando três avaliações. Os isolados BB-4 (*Bacillus cereus* GC subgrupo B), BS-3 (*Photorhabdus luminescens-luminescens*), BB-1 (*Bacillus alcalophilus*) e BB-6 (*Yersinia bercovieri*) apresentaram eficiência no controle do patógeno nos testes de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, com valores entre 31% e 46%. No desenvolvimento da doença em sementes e em plantas de soja, o controle foi superior a 50% e nos mesmos níveis dos tratamentos com os fungicidas tiofanato metílico + fluazinan e tiofanato metílico. Os resultados obtidos evidenciam um potencial de uso desses isolados bacterianos no biocontrole do mofo branco em soja, alternativamente ao uso de fungicidas químicos.

**Palavras-chave:** controle alternativo, *Sclerotinia sclerotiorum*, biocontrole

**Abstract** - The search for efficient biocontrol agents in agriculture has been achieved in several pathosystems. Thus, we carried out experiments under controlled conditions in greenhouse and laboratory, involving the use of bacteria *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus cereus* GC subgrupo B, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia bercovieri* and *Photorhabdus luminescens-luminescens* obtained from biofertilizers and bovine and suine manure. The bacterial strains were multiplied in nutrient-agar medium (NA) for 48 hours to evaluate the efficiency in inhibiting the mycelial growth and the development of *Sclerotinia sclerotiorum* in antagonism assays in Petri dishes containing BDA medium; or in aqueous suspension adjusted in  $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup> by Mac Farland scale, to seeds microbiolization and spraying the aerial parts of soybean plants, totalizing three assays. The bacterial strains BB-4 (*Bacillus cereus* GC subgrupo B), BS-3 (*Photorhabdus luminescens-luminescens*), BB-1 (*Bacillus alcalophilus*) and BB-6 (*Yersinia bercovieri*) tested were shown to be effective for inhibition of mycelial growth of the pathogen, with values between 31% and 46%, and disease development in soybean seeds and plants, with values above 50% and the same levels of control treatments with thiophanate methyl + fluazinan and thiophanate methyl. These results demonstrate the presence of promising strains in control of white mold alternatively the use of chemical fungicides.

**Keywords:** alternative control, *Sclerotinia sclerotiorum*, biocontrol

## Introdução

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, ocorre em mais de 400 espécies vegetais e tem sido considerado como a segunda doença mais importante na cultura da soja em todo o mundo (Li et al., 2010). No Brasil, a sua ocorrência é mais comum em regiões de condições climáticas amenas, tais como na região sul e nas chapadas dos cerrados, em altitudes superiores a 800m, porém, está presente em todas as regiões produtoras de soja, mesmo aquelas realizadas em clima tropical (Almeida et al., 2005; EMBRAPA, 2005), onde as perdas podem ser superiores a 40% (Demant, 2010; Jaccoud Filho et al., 2010). O controle é feito, principalmente, por meio de sementes sadias, rotação de culturas e tratamento químico com fungicidas (Almeida et al., 2005).

Os problemas advindos do uso indiscriminado dos agrotóxicos, tais como a contaminação ambiental, dos alimentos e dos consumidores, o aparecimento de populações resistentes de patógenos e a diminuição de populações de organismos benéficos ou não-álvos, tem aumentado o interesse em se desenvolver métodos de controle de doenças alternativos e menos impactantes aos ecossistemas onde a agricultura está inserida (Bettiol, 1991; Silva et al., 2004).

Nesse contexto, a utilização de biofertilizantes, produtos resultantes da digestão aeróbica ou anaeróbica de compostos orgânicos de origem vegetal e animal, tem se apresentado como uma forma viável e promissora para esse fim (Bettiol, 2003). Eles possuem uma elevada e complexa comunidade microbiana, com a presença de bactérias, fungos leveduriformes e filamentosos e actinobactérias, com ação sobre diversos fitopatógenos (Ferrari et al., 2012; Kupper et al., 2006; Tratch & Bettiol, 1997), que agem por meio de vários mecanismos, tais como a antibiose, competição por espaço e nutrientes ou pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro (Van Loon et al., 1998).

A comunidade microbiana e a composição química presente em um biofertilizante pode ser bastante variável, em função de uma série de fatores, tais como o método de preparo, tempo de decomposição, temperatura, pH do composto e composição dos materiais orgânicos utilizados no seu preparo (Marrocos et al., 2012), sendo, portanto, uma importante fonte para a prospecção de microrganismos com potencial de uso no biocontrole de fitopatógenos.

Assim, o objetivo desse trabalho foi o de selecionar isolados bacterianos presentes em biofertilizantes produzidos a partir de esterco bovino e suíno, com potencial de uso no controle biológico do agente causal do mofo branco, em testes sob condições de laboratório e de casa-de-vegetação.

## Métodos

### Obtenção de isolados bacterianos

Os isolados foram obtidos a partir da digestão aeróbica de biofertilizantes com 30 dias de produção, conforme o descrito por Santos (1992) modificado, a partir de esterco bovino e suíno provenientes de criações comerciais. Para o isolamento, utilizou-se o método de diluição seriada até  $10^{-9}$  e plaqueamento em meio nutriente-ágar (NA). Para triagem das melhores linhagens antagonistas, realizou-se uma seleção massal, por meio de testes de antagonismo *in vitro*, no qual foram colocados quatro isolados bacterianos distintos por placa contendo meio BDA, dispostos na forma de estria, equidistantes e nas extremidades das placas. No centro, foi colocado um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo a cultura do patógeno. Uma placa contendo um disco de 0,5 cm contendo micélio de *S. sclerotiorum*, sem a presença de qualquer isolado bacteriano serviu como tratamento controle. O período de tempo necessário para que o micélio do patógeno tomasse toda a superfície da placa contendo o meio de cultura, serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição, a qual foi realizada através de análise visual e em apenas uma repetição, sendo selecionados aqueles que apresentassem algum nível de inibição do crescimento do patógeno.

De um total de 48 isolados testados, oito foram selecionados para os testes subsequentes, sendo identificados por meio da análise do perfil dos ácidos graxos da membrana celular, em cromatógrafo a gás, usando o Software de Identificação Microbiana (MIDI, Sherlock® TSBA Library version 5.0, Microbial ID, Newark, DE, USA) (Tabela 1).

### Testes de crescimento micelial

Um disco de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio do patógeno foi colocado a 0,5 cm de uma das extremidades de placas de Petri contendo meio BDA. Na outra extremidade equidistante, uma estria transversal de propágulos de um isolado bacteriano selecionado. O tratamento controle consistiu da colocação, sobre a placa de Petri, de apenas um disco de meio de cultura contendo o fitopatógeno. O momento de avaliação do halo de inibição, representado pelo espaço entre a extremidade do crescimento micelial do patógeno e a colônia da bactéria antagonista, foi estabelecido como o período de tempo necessário para que o micélio do patógeno, sem a presença do isolado bacteriano, se desenvolvesse sobre todo o meio de cultura ( $25 \pm 2$  °C, 12 horas de fotoperíodo) Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com nove tratamentos (oito isolados bacterianos e uma testemunha) com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (5%). Para o cálculo do Controle Relativo (CR%), adotou-se a seguinte equação:

$$C.R.(%) = \frac{RT - RB}{RT} \times 100, \text{ sendo:}$$

RT = raio da colônia do patógeno no tratamento testemunha

RB = raio da colônia do patógeno pareada com o isolado bacteriano

#### Tratamento de sementes de soja

O substrato contendo o patógeno foi produzido em sacos plásticos de polipropileno contendo 200 gramas de areia lavada, 40 g de quirera de milho e 60 mL de água destilada, os quais foram lacrados e esterilizados em autoclave por duas vezes (120°C por 20 minutos, 1 atm de pressão) com um intervalo de 24 horas entre cada esterilização. Posteriormente, foram adicionados discos de 0,5 cm do micélio do patógeno e transferidos para um ambiente controlado (25±2°C, 12 horas de fotoperíodo) por um período de 15 dias até a completa colonização do substrato. Em seguida, vasos de um litro de capacidade contendo solo não esterilizado foram infestados com propágulos do patógeno (12 g.L<sup>-1</sup> de solo), cinco dias antes da semeadura.

Sementes de soja convencional, cultivar M-Soy 8866, foram imersas em suspensões bacterianas, obtidas a partir de colônias com 48 horas de crescimento em meio nutriente-ágar (NA), padronizadas em aproximadamente 10<sup>9</sup> ufc, de acordo com a escala de Mac Farland (Mantovanello & Melo, 1994) e mantidas sob agitação por 10 minutos, sendo colocadas 10 sementes por vaso no solo infestado com o patógeno. Realizou-se a avaliação do número de plantas germinadas oito dias após a semeadura. Cada isolado bacteriano consistiu um tratamento. Sementes imersas em água destilada consistiram na testemunha. Como testemunha positiva foi usado o fungicida tiofanato metílico + fluazinam (concentração 350,0 g.L<sup>-1</sup> + 52,5 g.L<sup>-1</sup>) na dosagem comercial (200 mL. 100 kg<sup>-1</sup> de sementes), totalizando 10 tratamentos com quatro repetições. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado e para a comparação das médias, teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo do Controle Relativo (CR%), adotou-se a seguinte equação:

$$C.R.(%) = \frac{(VC-VX)}{VC} \times 100, \text{ sendo:}$$

VC = % de redução na germinação no tratamento testemunha  
VX = % de redução na germinação no tratamento com o isolado bacteriano

#### Plantas de soja

Em vasos contendo substrato não esterilizado, foi realizada a semeadura com 10 sementes. Oito dias após, foi realizado um desbaste mantendo-se três plantas por vaso. Após 10 dias da germinação foi realizado a inoculação do patógeno na base do caule da planta, com palitos de madeira colonizados previamente por *S. sclerotiorum* à uma profundidade em que os palitos conseguissem se manter fixados na base da planta. Palitos de madeira esterilizados e sem a presença de *S. sclerotiorum* representaram o tratamento testemunha.

Para o preparo do inóculo do patógeno, palitos de madeira de aproximadamente 1,5 cm

foram introduzidos em duas camadas de papel filtro de forma a mantê-los na posição vertical. Em seguida, foram colocados em placas de Petri e autoclavados por duas vezes (120 °C por 20 minutos e um atm de pressão) com um intervalo de 24 horas entre cada esterilização. Em seguida, foi vertido meio BDA esterilizado nas placas de Petri contendo os papéis filtro juntamente com os palitos esterilizados, e posteriormente, realizada a repicagem do patógeno para as placas agarizadas e incubação a 25±2°C até a colonização de toda a placa e palitos de madeira.

No mesmo dia e após a introdução dos palitos de madeira colonizados com o patógeno na base do caule, realizou-se a pulverização da parte aérea de plantas de soja com os isolados bacterianos, a partir de colônias com 48 horas de crescimento em meio nutriente-ágar (NA), padronizadas em aproximadamente 10<sup>9</sup> ufc, de acordo com a escala de Mac Farland. Para isso, 24 horas antes e depois da pulverização das plantas com os agentes de biocontrole, as mesmas foram submetidas à câmara úmida, para a abertura dos estômatos e favorecimento do estabelecimento dos isolados bacterianos. Após esse período, as plantas foram transferidas e mantidas em casa-de-vegetação sob irrigação diária durante 10 dias, até a avaliação da severidade da doença, pela medição do comprimento das lesões, a partir do ponto de inoculação do patógeno na base das plantas.

Desta forma, os tratamentos consistiram da aplicação dos oito isolados bacterianos. Como testemunha negativa, água destilada esterilizada e como testemunha positiva, o fungicida tiofanato-metílico (concentração de 700g.kg<sup>-1</sup>) na dosagem comercial (70g.100L<sup>-1</sup> de água), totalizando dez tratamentos em quatro repetições. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado e para a comparação das médias, teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para o cálculo do Controle Relativo (CR%), adotou-se a seguinte equação:

$$C.R.(%) = \frac{(RC-RX)}{RC} \times 100, \text{ onde:}$$

RC= Comprimento da lesão no tratamento testemunha  
RX= Comprimento da lesão no tratamento com o isolado bacteriano

#### Resultados e discussão

Dos 48 isolados bacterianos obtidos, oito deles foram selecionados na seleção massal para serem testados nos ensaios subsequentes, por apresentarem algum nível de antagonismo frente a *S. sclerotiorum*, sendo posteriormente identificados (Tabela 1). Embora o método de identificação de isolados bacterianos provenientes do solo de acordo com o perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) seja amplamente utilizado, Oka et al. (2000) observaram discrepâncias no seu uso, gerando falsos positivos para *Arthrobacter globiformis*, *Micrococcus kristinae* e *M. luteus*. Por outro lado, outros autores consideram este método confiável para a identificação de *Bacillus* spp. provenientes da

rizosfera no solo (Srnivasan et al., 1996) e também para a identificação de espécies de *Staphylococcus* e *Micrococcus*, com uma acurácia de 98%, quando comparado com culturas de referência American Type Culture Collection - ATCC, considerando como confiáveis valores iguais ou superiores 0,300 para o

índice de similaridade entre a amostra e a biblioteca do programa MIDI (Pendergrass & Jensen, 1997). No presente trabalho, apenas *Yersinia bercovieri* apresentou um índice de similaridade abaixo daquele considerado confiável, com um valor de 0,270.

Tabela 1 - Identificação de isolados bacterianos provenientes de biofertilizantes, obtidos por seleção massal para o controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, de acordo com o perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME).

Código	Identificação	Índice de similaridade*	Matriz de isolamento
BB-1	<i>Bacillus alcalophilus</i>	0,391	bovino
BB-4	<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B	0,539	bovino
BB-5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,515	bovino
BB-6	<i>Yersinia bercovieri</i>	0,270	bovino
BS-2	<i>Photorhabdus luminescens-luminescens</i>	0,469	suíno
BS-3	<i>Photorhabdus luminescens-luminescens</i>	0,418	suíno
BS-5	<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B	0,688	suíno
BS-6	<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B	0,658	suíno

\*Parâmetro de semelhança entre a amostra e a biblioteca do programa MIDI – Sherlock Microbial Identification System

Nos testes de antagonismo com culturas pareadas, visando mensurar a capacidade dos isolados bacterianos selecionados em inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, observou-se que quatro deles (BB-4, BB-6, BS-2 e BS-6) foram eficientes na inibição do desenvolvimento do patógeno, com níveis de inibição entre 31% e 45% e diferindo significativamente do tratamento testemunha (Tabela 2).

Um grande número de antagonistas potencialmente eficientes tem sido pré-selecionados em testes de antagonismo *in vitro*, devido às dificuldades apresentadas pelos métodos de seleção realizados a campo, como o custo, mão-de-obra, tempo e espaço necessários serem elevados (Xiujun et al., 1996). Segundo Mariano (1993) os testes de antagonismo *in vitro* têm a capacidade de detectar os principais mecanismos de ação utilizados por agentes de controle biológico sobre fitopatógenos, como antibiose, competição por nutrientes e parasitismo e no qual o halo de inibição pode variar, de acordo com a eficiência do metabólito produzido pelo agente de controle biológico.

No teste de germinação de sementes de soja em substrato infestado previamente com o patógeno, os isolados bacterianos BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*) e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) diferiram significativamente da testemunha, com aumento na taxa de germinação de sementes na ordem de 35% a 58%, com destaque para o isolado BB-6 (*Y. bercovieri*), cujos níveis de controle foram equivalentes aos do fungicida tiofanato metílico + fluazinam (Tabela 3).

Na avaliação do controle do mofo branco em plantas de soja, observou-se que os isolados BB-1 (*B. alcalophilus*), BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-5 (*S. maltophilia*), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*), BS-3 (*P. luminescens luminescens*) e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) diferiram significativamente da testemunha, com níveis de controle entre 25% e 70% (Tabela 4).

Desses isolados, BB-5 (*S. maltophilia*), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*) e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) se destacaram dos demais, com níveis de controle superiores a 50%, não apresentando diferença estatística significativa, quando comparados com o tratamento com o fungicida tiofanato metílico.

Dos isolados bacterianos testados, BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*) e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) foram efetivos em todos os testes realizados, tanto na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, como no controle do mofo branco em sementes e em plantas de soja.

Resultados semelhantes foram obtidos por Valiati et al. (2012) que observaram a inibição do crescimento micelial de *Aspergillus* sp. por *Y. bercovieri* visando o controle biológico de doenças em pós-colheita na cultura do amendoim, na ordem de 24,6%. Outros autores também relataram a ação de *B. cereus* GC subgrupo B, *P. luminescens luminescens*, *B. alcalophilus*, *Y. bercovieri* e *S. maltophilia* na inibição do desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em níveis superiores a 70% (Medeiros et al., 2012a) e de *Colletotrichum gloeosporioides* por esses mesmos isolados bacterianos, na ordem de 45 a 53% (Medeiros et al., 2012b), em testes de antagonismo "in vitro".

É conhecida a capacidade de *Bacillus* spp. em produzir diferentes compostos antibióticos e enzimas extracelulares, tais como glucanases e quitinases (Bal et al., 2009; Hirasawa et al., 2006), relacionadas à degradação da parede celular de fitopatógenos como *Phytophthora cinnamomi* e *P. fragariae* (Valois et al., 1996). Vários autores têm relatado a ocorrência de *B. cereus* como endófito nas culturas do algodão, milho, citros e café (Di Fiore & Del Gallo, 1995; Shiomi et al., 2006) e de sua ação promotora de crescimento vegetal em várias espécies vegetais, tais como tomate e trigo (Simon et al., 2001; Ryder et al., 1999). Adicionalmente, essa bactéria pode agir no controle

de doenças por meio de outros mecanismos, tais como quitinases e substâncias fungitóxicas, que conferem proteção a *Fusarium sambucinum* na cultura da batata (Safdi et al., 2002); *Rhizoctonia solani* (Ryder et al., 1999) e *Helminthosporium solani* (Martinez et al., 2002). Embora não tenham sido encontrados relatos da ação de *B. alcalophilus*

sobre fitopatógenos, essa bactéria é capaz de produzir enzimas extracelulares, tais como amilases e proteases (Bal et al., 2009), o que poderia explicar a sua ação sobre *S. sclerotiorum* no presente estudo.

Tabela 2 - Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados bacterianos provenientes de biofertilizantes em testes de antagonismo em culturas pareadas em meio BDA.

Tratamentos	R.C. <sup>1</sup> (cm)	C.R. <sup>2</sup> (%)
Testemunha	7,5a*	0,0
BB-1 ( <i>Bacillus alcalophilus</i> )	7,0a	6,7
BB-4 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	5,1bc	31,2
BB-5 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	6,8ab	8,4
BB-6 ( <i>Yersinia bercovieri</i> )	4,1c	45,6
BS-2 ( <i>Photobacterium luminescens-luminescens</i> )	5,1c	33,5
BS-3 ( <i>Photobacterium luminescens-luminescens</i> )	7,2 <sup>a</sup>	3,5
BS-5 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	6,8ab	9,5
BS-6 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	4,8c	36,2
C.V.	9,87	-

\* Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Raio médio da colônia

<sup>2</sup> Controle Relativo

Tabela 3 - Porcentagem de germinação de sementes de soja M-Soy 8866, submetidas à microbiolização com isolados bacterianos em solo infestado com *Sclerotinia sclerotiorum*, oito dias após a semeadura.

Tratamentos	Germinação (%)	CR <sup>1</sup> (%)
Água (Controle)	20,0d*	00,0
BB-1 ( <i>Bacillus alcalophilus</i> )	30,0d	12,5
BB-4 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	52,0bc	35,0
BB-5 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	35,3cd	19,1
BB-6 ( <i>Yersinia bercovieri</i> )	66,7ab	58,4
BS-2 ( <i>Photobacterium luminescens</i> )	52,0bc	48,0
BS-3 ( <i>Photobacterium luminescens</i> )	25,3d	40,0
BS-5 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	30,0d	12,5
BS-6 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	55,3b	44,1
Tiofanato metílico + Fluazinam	80,0a	75,0
C.V.	16,35	-

\* Médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Controle Relativo

*P. luminescens* é conhecida como uma enterobactéria que vive em simbiose com nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* e que, após a sua liberação no interior das formas larvais dos insetos, produz uma ampla variedade de compostos tóxicos (Chen et al., 1994). Além da ação desses compostos tóxicos que acarretam a morte do inseto parasitado, *P. luminescens* produz compostos

antimicrobianos, tais como derivados de antraconas, estilbenoides, compostos fenólicos e antibióticos não identificados, que impedem o estabelecimento de outros microrganismos, tais como bactérias e fungos leveduriformes e a consequente decomposição do inseto parasitado, conferindo-lhe grande capacidade antagonística (Forst et al., 1997; Hu & Webster, 2000).

Tabela 4. Controle do mofo branco em plantas soja submetidas à pulverização da parte aérea com isolados bacterianos.

Tratamentos	C.L. <sup>1</sup> (cm)	C.R. <sup>2</sup> (%)
Água (Controle)	10,0a*	0
BB-1 ( <i>Bacillus alcalophilus</i> )	7,5bcd	25,0
BB-4 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	6,0bcde	40,0
BB-5 ( <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> )	5,0cdef	50,0
BB-6 ( <i>Yersinia bercovieri</i> )	3,0f	70,0
BS-2 ( <i>Photobacterium luminescens-luminescens</i> )	4,8def	52,5
BS-3 ( <i>Photobacterium luminescens-luminescens</i> )	7,5abc	25,0
BS-5 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	8,5ab	15,0
BS-6 ( <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B)	3,8ef	62,5
Tiofanato Metílico	2,8f	72,5
C.V.	31,47	-

\* Médias não seguidas de mesma letra diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Comprimento médio da lesão

<sup>2</sup> Controle relativo

As espécies de *Yersinia* tem sido encontradas em toda a parte, como no solo, fontes de água fresca e em esgotos humanos e de animais domésticos (Merhej et al., 2008), sendo *Y. bercovieri* amplamente conhecida como uma bactéria enterocolítica, causadora de doenças no trato gastrointestinal de seres humanos (Sulakvelidze et al., 1999). Embora se tenha observado a sua ação sobre *S. sclerotiorum* no presente trabalho, não foram encontrados relatos no biocontrole de doenças ou mesmo o seu modo de ação sobre fitopatógenos.

Embora se tenha evidenciado a ocorrência de isolados bacterianos promissores no biocontrole de fitopatógenos, há a necessidade da realização de mais estudos para a avaliação do seu real potencial de uso para esse fim, como: o seu modo de ação, aplicação em diferentes densidades populacionais, sua ação conjunta, ou mesmo a sua reação a fatores abióticos, tais como a exposição a agroquímicos.

### Conclusões

As bactérias BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*), e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) inibem o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

As bactérias BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*), e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) reduzem a severidade do mofo branco quando inoculadas em sementes de soja.

As bactérias BB-1 (*Bacillus alcalophilus*), BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-5 (*Stenotrophomonas maltophilia*), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*) e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) são eficientes na redução da severidade do mofo branco, quando pulverizadas na parte aérea de plantas de soja.

As bactérias BB-4 (*B. cereus* GC subgrupo B), BB-6 (*Y. bercovieri*), BS-2 (*P. luminescens luminescens*) e BS-6 (*B. cereus* GC subgrupo B) são eficientes, tanto na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, quanto no controle do mofo branco em sementes e na parte aérea de plantas de soja.

### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.E.V.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A. Doenças da soja (*Glycine* Max). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) Manual de fitopatologia. Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Ed. São Paulo SP, Ceres. p.565-568, 2005.

BAL, S.; MISHRA, R.R.; RATH, B.; SAHU, H.K.; TRATOI, H.N. Characterization and extracellular enzyme activity of predominant marine *Bacillus* spp.

isolated from sea water of Orissa Coast, India. Malaysian Journal of Microbiology, Penang, 5 (2):87-93, 2009.

BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds.). Métodos alternativos de controle fitossanitário, Jaguariúna, CNPMA Embrapa, 2003. 279p.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna, EMBRAPA, 388p, 1991.

CHEN, G.; DUNPHY, G.B.; WEBSTER, J.M. Antifungal activities of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. Biological Control, Amsterdam, 4: 157-162, 1994.

DEMANT, C. A. R. Mofo branco e seu manejo no oeste baiano. Boletim Passarela da Soja, 2. Luis Eduardo Magalhães, Fundação Bahia, 32p, 2010.

DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. (Eds.) *Azospirillum* VI and related microorganisms. Berlin, Springer-Verlag, p.169-187, 1995.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina, Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2005. (Comunicado Técnico 76).

FERRARI, E.; VALIATI, S.; SHIOMI, H.F. Efeito de biofertilizantes no biocontrole de *Penicillium* sp. em laranja "pêra". Scientific Electronic Archives, Sinop, 1: 1-5, 2012.

FORST, S.; DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 51: 47-72, 1997.

HIRASAWA, K.; UCHIMURA, K.; KASHIWA, M.; GRANT, W.; ITO, S.; KOBAYASHI, T.; HORIKOSHI, K. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 89 (2): 211-219, 2006.

HU, K.; WEBSTER, J.M. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus-Heterorhabditis*

- infected *Galleria mellonella* larvae. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, 189: 219-223, 2000.
- JACCOUD FILHO, D.S.; MANOSSO NETO, M.O.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F.F.; DEMARCH, V.B.; ROCHA, C.H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná. Resumos... Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, Brasília, Embrapa-Soja, 31, p.226-228, 2010.
- KUPPER, K.C.; BETTIOL, W.; GÓES, A.; SOUZA, P.S.; BELLOTTE, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. Crop Protection, Guilford, 25: 569-573, 2006.
- LI, D.; SUN, M.; HAN, Y.; TENG, W.; LI, W. Identification of QTL underlying soluble content in soybean content in soybean white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). Euphytica, Wageningen, 172: 49-57, 2010.
- MANTOVANELLO, C.M.; MELO, I.S. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Summa Phytopathologica, Botucatu, 20 (2): 123-126, 1994.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, 1:369-409, 1993.
- MARROCOS, S.T.P.; NOVO JUNIOR, J.; GRANGEIRO, L.C.; AMBRÓSIO, M.M.Q.; CUNHA, A.P.A. Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. Revista Caatinga, Mossoró, 25 (4): 34-43, 2012.
- MARTINEZ, C.; MICHAUD, M.; BELANGER, R.R.; TWEDDELL, R.J. Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, 34: 1861-1868, 2002.
- MEDEIROS, E.J.; BULHÕES, C.C.; SANTOS, B.T.; SHIOMI, H.F. Ação antagônica de isolados bacterianos sobre *Colletotrichum gloeosporioides* em testes 'in vitro'. Tropical Plant Pathology, Brasília, 37 (Supl.), 2012a, 1 CD-ROM.
- MEDEIROS, E.J.; BULHÕES, C.C.; SANTOS, B.T.; SHIOMI, H.F. Avaliação da ação antagônica de isolados bacterianos sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* 'in vitro'. Tropical Plant Pathology, Brasília, 37 (Supl.), 2012b, 1 CD-ROM.
- MERHEJ, V.; ADÉKAMBI, T.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, 58: 779-784, 2008.
- OKA, N.; HARTEL, P.G.; FINLAY-MOORE, O.; GAGLIARDI, J.; ZUBERER, D.A.; FUHRMANN, J.J.; ANGLE, J.S.; SKIPPER, H.D. Misidentification of soil bacteria by fatty acid methyl ester (FAME) and BIOLOG analyses. Biology and Fertility of Soils, Berlin, 32: 256-258, 2000.
- PERNDERGRASS, S.M.; JENSEN, P.A. Application of the gas chromatography-fatty acid methyl ester system for the identification of environmental and clinical isolates of the Family Micrococcaceae. Applied Occupational and Environmental Hygiene, Philadelphia, 12 (8): 543-546, 1997.
- RYDER, M.H.; YAN, Z.; TERRACE, T.E.; ROVIRA, A.D.; TANG, W.H.; CORRELL, R.L. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. Soil Biology and Biochemistry, Elmsford, 31: 19-29, 1999.
- SAFDI, N.; CHÉRIF, M.; HAJLAOUI, M.R.; BOUDABBOUS, A. Biological control of the potato tubers dry rot caused by *Fusarium roseum* var. *sambucinum* under greenhouse, field and storage conditions using *Bacillus* spp. isolates. Journal of Phytopathology, Berlin, 150: 640-648, 2002.
- SANTOS, A.C.V. Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza. Niterói, Emater-Rio, 1992. (Agropecuária Fluminense, 8)
- SHIOMI, H.F.; SILVA, H.A.S.; MELO, I.S.; NUNES, F.V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. Scientia Agricola, Piracicaba, 63 (1): 32-39, 2006.
- SILVA, H.A.S.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and enzyme activities. Biological Control, Amsterdam, 29: 288-295, 2004.
- SIMON, H.M.; SMITH, K.P.; DODSWORTH, J.A.; GUENTHNER, B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 67: 514-520, 2001.
- SRINIVASAN, M.; HOLL, F.B.; PETERSEN, D.J. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. Canadian

Journal of Microbiology, Ottawa, 42 (10): 1006-1014, 1996.

SULAKVELIDZE, A.; KREGER, A.; JOSEPH, A.; ROBINS-BROWNE, R.M.; FASANO, A.; DE TOLA, L.; MORRIS JR, G. Production of enterotoxin by *Yersinia bercovieri*, a recently identified *Yersinia enterocolitica*-like species. Infection and Immunity, Washington, 62 (2): 968-971, 1999.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 32: 1131-1139, 1997.

VALIATI, S.; FERRARI, E.; SHIOMI, H.F. Efeito de isolados bacterianos no biocontrole "in vitro" de *Aspergillus* sp. Scientific Electronic Archives, Sinop, 1:11-15, 2012.

VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARBASUBIYE, T.; GARON, M.; DÉRY, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 62: 1630-1635, 1996.

XIUJUN, Z.; SHIXIANG, W.; YI, Z.; QI, Z. Screening biocontrol agents for *Pythium*-induced disease by germinating carrot seeds in Petri dish – a rapid and effective method. In: WENHUA, T.; COOK, J.R.; ROVIRA, A. Advances in Biological Control of Plant Diseases. Beijing: China Agricultural University Press, p.140-144, 1996.