



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2020

Efeito antagônico de isolados fúngicos e bacterianos da Coleção de culturas de microorganismos da Bahia (CCMB) sobre fitopatógenos.

Rebeca Dos Santos Silva¹ e Leandro Alvarenga Santos²

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

rebecals@bol.com.br

2. Orientador, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

Leandro.alvarenga.s@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Zea mays*; *Solanum lycopersicum*; *Trichoderma*; *Bacillus*.

INTRODUÇÃO

Nos atuais sistemas de produção agrícolas diversos são os fatores que limitam o alcance do potencial produtivo das mais variáveis culturas. Dentre estes fatores podemos citar a falta de correção da acidez do solo, adubação ineficiente, estresses climáticos como estiagem ou geadas e os problemas fitossanitários como pragas, doenças e plantas daninhas.

Estima-se que as doenças de plantas causem um total de redução de aproximadamente 18% na agricultura mundial (Agrios, 2011). Dentre as diferentes espécies cultivadas no semi árido, podemos destacar o milho (*Zea mays*), o qual é acometido por diversas doenças como a Cercosporiose (*Cercospora zea-maydis*), Mancha branca (*Pantoea ananas*), Ferrugem Polissora (*Puccinia polysora*), Ferrugem Comum (*Puccinia sorghi*), Helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) e a Estria Bacteriana (*Xanthomonas vasculicola* pv *vasculorum*) a cultura da palma forrageira acometida por doenças como Podridão escamosa (*Stalidium lignicola*), Mancha de Alternária (*Alternaria tenuis*) e Podridão de Fusarium (*Fusarium Solani*).

Uma alternativa ao controle convencional de doenças de plantas é a utilização de práticas culturais adequadas e alternativas de manejo, dentre elas o uso do controle biológico, que possuem como organismos mais usuais e estudados espécies do gênero *Trichoderma* e *Bacillus*. O gênero *Trichoderma* têm sido estudados por produzirem uma série de enzimas extracelulares, por degradarem parede celular fúngica e por serem ativas na produção de metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana (MELO, 1991). Dos antibióticos produzidos por *Trichoderma*, Bastos (1996) cita gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina, que têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos. Associado ao fato de serem capazes de produzirem uma série de enzimas extracelulares, tais como quitinase, lípases, proteases e glucanases (SHARON et al., 2001; SUAREZ et al, 2004).

Alguns microrganismos, além de terem o efeito inibidor de patógenos de forma direta, também podem atuar como promotores de crescimento de planta (PCP) e

induzirem a resistência (Pieterse et al., 2005). Alguns biofertilizantes líquidos (a base de fungos do gênero *Trichoderma*) tem a capacidade de além de melhorar a produção, como PCP, a de proteger as plantas, visto que além de fertiprotetores, podem atuar como potentes elicitores de indução de resistência, segundo Barbosa e Medeiros (2007) essa ideia deve-se provavelmente à diversidade biótica e abiótica obtida na composição final desses fermentados. E também existem microrganismos que tem um amplo espectro de ação, pois além de possuírem atividade inseticidas também protegem as plantas de fitopatógenos, exemplo disso são algumas substâncias produzidas pelo *Bacillus subtilis*.

Dentre os isolados de *Trichoderma* presentes no acervo da CCMB estão as espécies: *Trichoderma asperelloides*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. ovalisporum*, *T. spirale* e *T. stromaticum*.

Alguns estudos revelaram que isolados do gênero *Bacillus*, especialmente da espécie *Bacillus subtilis* é também capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica (KAI et al. 2007), além da produção de uma vasta gama de bioprodutos de ampla utilidade como, por exemplo, os antibióticos e antifúngicos peptídicos para o controle de doenças de plantas, entre os quais se encontram a iturina e a fengicina (WESTERS, 2004). Inúmeros bioprodutos comerciais a base de *Bacillus* estão registrados pela United States Environmental Protection Agency (USEPA), sendo indicados como fungicida e bactericida para diversas culturas presentes no semiárido como tomate, milho e hortaliças (FILHO, et al., 2010). No Brasil produtos como Sonata®, Eco-Shot®, Serifel®, Oleaje® já possuem registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para controle de fungos e nematoides.

Dentre os isolados de *Bacillus* presentes no acervo da CCMB estão as espécies: *Bacillus methylotrophicus*, *B. cereus* e *B. subtilis*.

O projeto objetiva a verificar o efeito inibitório de isolados presentes na Coleção de culturas de microrganismos da Bahia (CCMB) sobre fitopatógenos da cultura do tomate.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

- Práticas laboratoriais

Os materiais antes do manuseio eram separados e esterilizados. Desta forma, todas as vidrarias e plásticos autoclaváveis foram embalados por pedaços de papel metro de modo que estivessem veladas adequadamente e etiquetadas com nome do usuário e data. Em seguida, eram direcionados a autoclave, equipamento eficaz para a esterilização destes materiais. As placas de Petri contendo material contaminado também passava por esterilização para a destruição de micro-organismos antes do descarte.

- Preparo do meio de cultura

Os meios de cultura produzidos foram o Mueller Hinton (MG) + àgar utilizado para bactérias e o Yeast extract – Peptone – Dextrose (YPD), nas concentrações 1%, 2%, 2% respectivamente utilizado para leveduras. O pó de cada meio foi pesado separadamente no beguér, transferido para o erlenmeyer e adicionado água destilada seguindo a quantidade de mistura especificada na embalagem do produto,

posteriormente agitou-se cuidadosamente cada meio com movimentos circulatorios e inseriu ao micro-ondas para ferver, agitando sempre para dissolver na água por 1 minuto. Assim que homogeneizados, os erlenmeyer contendo os meios de culturas eram autoclavados a tampa meia rosca. Após autoclavados, ainda quentes, os meios foram vertidos em placas de Petri dentro da capela de fluxo laminar e deixadas semiabertas até que esfriassem a temperatura ambiente, as placas foram fechadas, etiquetadas e colocadas em estufa a temperatura de 37°C por aproximadamente 24 horas, em seguida, as placas foram colocadas na geladeira.

- Semeadura em meio

As placas de Petri contendo o meio de cultura foram retiradas da geladeira e colocadas na estufa a 37°C por alguns minutos para atingir uma temperatura mais compatível ao microrganismo. O microrganismo foi retirado da geladeira de germinação B.O.D e colocado na capela de fluxo laminar já esterilizada. As placas com o meio já na capela foram marcadas ao fundo informando o microrganismo, nome do proprietário e data. A alça de platina utilizada para pegar o inóculo foi flambada e deixada esfriar, a placa de Petri com o meio foi aberta próximo à chama do bico de Bunsen e com a alça coletou o inóculo e levemente foi introduzido no meio de cultura fazendo estrias bem juntas espalhando-o até o esgotamento do material contido a alça. Logo após feito as semeaduras, as placas foram invertidas e colocadas na estufa a aproximadamente 37°C. Após as 24 horas, tempo necessário para o crescimento da bactéria, foi observado seu desenvolvimento, se não foi contaminada durante o manuseio e se as colônias foram isoladas. Procedimento foi realizado repetitivas vezes para pratica das estrias e obtenção das colônias isoladas.

- Levantamento bibliográfico

Durante o período de distanciamento social foi realizado um levantamento bibliográfico com o propósito de obter um profundo entendimento de determinados resultados baseando-se em estudos anteriores, comparando informações de fontes diferentes para ampliar uma visão geral do que se pretendeu alcançar. Foram utilizadas produções técnico-científicas encontradas nas bases de dados disponíveis na Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Scielo e Google Acadêmico. As pesquisas foram realizadas entre janeiro a julho de 2020.

Os descritores utilizados para a busca de artigos nessas bases foram:

- Antagonismo
- Bioreguladores/ controle biológico
- Interação planta- patógeno-antagonista
- Gênero *Tchicoderma* atuação antagonista

- Gênero *Bacillus* atuação antagonista

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Preparo do meio de cultura

As placas contendo o meio de cultura após 24 horas na estufa a 37°C foram analisadas, caso aparentassem visualmente evidências de contaminação, as plantas eram descartadas para o uso sendo imediatamente direcionadas à autoclave, as placas de Petri que não apresentaram contaminação foram guardadas na geladeira até o dia do uso.

Semeadura em meio

Mediante as várias repetições, a prática de fazer estrias tanto simples como compostas foram aprimoradas e adquirindo placas sem contaminação e colônias isoladas.

Levantamento bibliográfico

As práticas culturais do controle biológico têm na sua finalidade gerar um ambiente favorável ao antagonista com o objetivo de manter um equilíbrio, de maneira que a planta não sinta perdas significativas no aparecimento do patógeno devido a ação dominante do antagonista (Bizi, 2005), ou seja, fazer a aplicação de um microrganismo para o controle do outro. Para Baker e Cook (1974), as práticas do controle biológico consistem na interação entre o patógeno, planta hospedeira e o antagonista resultando na redução das atividades do patógeno ou possibilitando uma maior resistência do hospedeiro. De maneira geral, o papel do microrganismo antagonista pode desenvolver efeito biocida, quando há morte do patógeno, ou biostático impossibilitando seu crescimento (Zambolim, 2010).

Com o objetivo de cada vez mais manter práticas saudáveis ao meio ambiente, na busca de diminuir a demanda de fungicidas químicos que contaminam o agrossistema, o uso de biorreguladores com ações antagonistas tem aumentado e obtido resultados bastante satisfatório em muitas culturas. Entre eles, o gênero *trichoderma*, atestado como controlador natural de diversos fitopatogênicos (Melo, 1991). Segundo Menezes e Souza (1995), tem-se estudado muito sobre as espécies desse gênero devido a uma série de enzimas extracelulares que produzem degradando paredes de células fúngicas, além de produzirem metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana. De acordo com Melo (1996), os conídios e clamidósporos de *trichoderma* são formulados e utilizados para tratamentos de solos, sementes, estolões, bulbos, como também pulverizados na parte aérea dos vegetais.

A ação do *Trichoderma* acontece por meio da associação ou não dos mecanismos de hiperparasitismo, antibiose e competição (Melo, 1998). A atuação do hiperparasitismo do *trichoderma* ocorre através da identificação de hifas de fungos suscetíveis crescendo em sua direção, devido a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira, formando estruturas idênticas a apressórios e enrolando-se fortemente em toda a sua extensão e assim penetrando e digerindo a hifa (Silva, 1997). Na antibiose um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (Stadnik e Bettiol, 2000). Muitas espécies de *Trichoderma* já estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e

destruir propágulos de fungos fitopatogênicos (Harman, 2000). A competição é uma excelente característica dos isolados do *trichoderma*, pois os organismos competem entre si para obter nutrientes, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio e muito dos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes, fazendo com que os isolados se sobressaia sobre eles. (Melo, 1998; Harman, 2000).

Na cultura do tomate, existem várias pesquisas que apontam o controle de doenças através do uso desse gênero, como por exemplo, trabalhos realizados por Montalvão (2012), onde constatou quem isolados da espécie *T. harzianum* (CEN 281 E CEN 287) apresentaram potencial de biocontrole a doenças causadas por *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*. Em outro estudo contra incidência do *S. rolfsii*, o uso de isolados diminui o índice de infecção a 0,2% enquanto na testemunha o índice de infecção foi de 3,6% (Tavares, 1995). Já Fontes(2013) realizou um estudo onde constatou a eficiente do isolado T25 no controle da murcha-de-fusário do tomateiro reduzindo em 71,2% de sua severidade, mas para os outros isolados a respostas para redução da severidade da doença foi menor, constatando que diferentes isolados do gênero variam quanto sua capacidade de biocontrole, equiparando a esta observação, encontramos os trabalhos do Ethur et al. (2008), que no controle desta mesma doença, provou que o isolado HTSRS controlou a murcha-de-fusário em até 56%.

Outros microrganismos antagonistas bastante utilizados no biocontrole de varios fitopatogenicos é do gênero *Bacillus*, principalmente devido a sua capacidade de formar endósporo e produzirem uma serie de antibióticos, além de gerar várias substâncias antimicrobianas (Edwards & Seddon 2001). O endósporo se resume a uma estrutura que possibilita a sua sobrevivência em diferentes situações, além de proporcionar que as bactérias driblem as defesas dos fitopatógenos (Otavio et al 2018). Segundo Mannavov e Sattarova (2001) os *Bacillus spp* produzem lantibióticos, que são peptídeos antibacterianos que possuem características estruturais únicas, contendo o aminoácido lantionina e/ou metil-lantionina. Os antibióticos possuem alta atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas como *Propionibacterium acnes*, estafilococos, estreptococos e clostrídios.

Diferentes estudos apontam que este gênero é capaz de produzir mais de setenta diferentes antibióticos, e *B.subtilis* é um dos maiores produtores destas substâncias no gênero (Pagno,2009). Segundo Asaka (1998) a espécie *B. Subtilis* apresenta atividade in vitro contra vários tipos de patógenos para diferentes espécies cultivadas por meio da produção de antibióticos como iturina A e surfactina, capazes de inibir o crescimento micelial de fungos. De acordo com Bacon et al (2001) esta mesma espécie diminuiu os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium moniforme*. Já nas pesquisas realizadas por Baltdotto et al (2010) o uso dessa espécie reduziu a incidência de *R. solani*, *Pythium sp* na batata doce e tomate.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Devido a inviabilidade dos isolados fúngicos e bacterianos da Coleção de culturas de microrganismos da Bahia (CCMB) e o período de distanciamento social devido a Pandemia de COVID-19, grande parte do trabalho não pode ser realizado. Entretanto, por intermédio das práticas laboratoriais foi adquirido as competências necessárias e fundamentais à realização das atividades. Conhecimento sobre diferentes meio de culturas utilizados para o crescimento e multiplicação necessária dos

microrganismos, permitindo seu estudo, identificação e análise. Entendimento e habilidades na execução de estrias simples e compostas para se obter colônias isoladas dos microrganismos. Aprendizado sobre diferentes estudos que comprovam o potencial antagonista de muitos isolados dos gêneros de *Trichoderma* e *Bacillus* de várias localidades distintas, constando que o habitat de onde foram retirados os isolados também pode atuar por diferentes mecanismos de ação contra os hospedeiros, possibilitando ampliar o espectro de eficiência do controle.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Métodos em fitopatologia**. UFV, 2007.
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, 2001.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2010.
- BAKER, K.F; COOK, R. J. Controle biológico de patógenos vegetais. San Francisco: W.F. Freeman, 1974.
- BASTOS, C. N. Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauzeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 509-512, 1996.
- BIZI, R. M; GRIGOLETTI JR.; A; AUER, C. G. Seleção de fungicidas para Controle de Oídio em Eucalipto. **Pesquisa Florestal**, v. 51, p. 165-175, 2005.
- EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **J. Appl. Microbiolol**, 2001
- EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 135-156.
- ETHUR L. Z; BLUME E; MUNIZ; MFB, CAMARGO R.F; FLORES; MG; CRUZ J. L. G; MENEZES J. P. *Trichoderma harzianum* no desenvolvimento e na proteção de mudas contra a fusariose do tomateiro. **Ciência e natureza**. 2008
- FONTES, M. G. Potencial de isolados de *trichoderma* e de leveduras no biocontrole da murcha-de-fusário do tomateiro. Recife, 2013.
- HARMAN, G.E. - Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, 2000.
- KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v.187, p.351–360, 2007.

MANNANOV, R.N.; SATTAROVA, R.K. Antibiotics produced by Bacillus bacteria. **Chemistry of natural Compounds**, 2001.

MEDEIROS, F.H.V.; SILVA, J.C.P.; PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças de plantas. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A.; **Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. v.1, p. 261-274.

MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. (Ed.) - **Controle Biológico**, v.1. Jaguariúna, Embrapa, 1998.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma spp.* no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 135-156.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p.261-295, 1996.

MEZEZES, M.; SOUZA, E.E.B. Avaliação de isolados de *trichoderma* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, n.20. 1995

MONTALVÃO, S. C. L. Potencial de *trichoderma spp.* No biocontrole de doenças do tomateiro. Brasília, 2012.

OTAVIO, P; FROIO, R; TAMATA, A. F. R; LOST, R. biocontrole de mofo branco em soja com *Bacillus spp.* **XLI Congresso Paulista de Fitopatologia**. São Paulo. 2018

PAGNO, S.R. avaliação do potencial antagônico de isolados de *bacillus spp.* no controle de fungos fitopatogênicos, causadores de podridões no período pós-colheita da maçã. **Programa de pós-graduação em biotecnologia**. 2009

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 91, p. 687-693, 2001.

SILVA, A.C.F. Uso da radiação gama para obtenção de mutante de *trichoderma harzianum* Rifai e *T. Viride Pers.* Fr. Com capacidade melhorada no controle ao *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. 1997.

STADNIK, M.J. E BETTIOL, W. Controle biológico de oídeos. In: Melo, I.S. Azevedo, J.L. (Ed.) - Controle biológico. v.3. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2000

SUAREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P.; MONTE, E.; LOBELLO, A. Isolation and characterization of PRA1, a trypsinlike protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.65, p. 46-55, 2004.

TAVARES, S. C. C de H.; PREZOTTI, J. C. G. de O; LIMA, J. A. S. *Trichoderma spp* no controle de fitopatogenos de solo na cultura do tomate em áreas de pequeno produtor, 1995.

ZAMBOLIM, L. Proteção de planta: Manejo Integrado de Doenças de Plantas. Viçosa, 2010.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. Bacillus subtilis as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: a Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 299-310, 2004.