

Atividade antagônica in vitro de *Sclerotium* sp. por *Bacillus* sp.

In vitro antagonistic activity of *Sclerotium* sp. by *Bacillus* sp.

Actividad antagónica in vitro de *Sclerotium* sp. por *Bacillus* sp.

Recebido: 14/09/2022 | Revisado: 29/09/2022 | Aceitado: 03/10/2022 | Publicado: 10/10/2022

Melissa Alezandra Romero Zambrano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3601-6034>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: melissa.romero@mail.uft.edu.br

Gianny Roger Parra Castanharo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4870-662X>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: rogercastanharo@gmail.com

Raimundo Wagner de Souza Aguiar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5169-4968>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: rwsa@mail.uft.edu.br

Aloísio Freitas Chagas Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7489-8701>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: chagasjraf@mail.uft.edu.br

Resumo

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. têm alto potencial para o controle biológico de fungos fitopatogênicos. Portanto, na presente pesquisa nos propusemos avaliar a capacidade antagônica de isolados de *Bacillus* sp. contra o fungo fitopatogênico *Sclerotium* sp. Os testes foram realizados utilizando dois métodos (dual e dual modificado), assim como cinco isolados de *Bacillus* sp. (LBM01, LBM02, LBM03, LBM04 e LBM06). As avaliações do crescimento micelial foram realizadas no meio de cultura BDA. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 h a 28 ± 1 °C durante 7 dias. O crescimento radial dos patógenos foi medido nos intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. A porcentagem de inibição foi calculada através da equação: $I\% = [(C-T)/C] \times 100$. Todos os isolados de *Bacillus* sp. testados foram capazes de inibir o crescimento micelial do *Sclerotium* sp. em até 72 h, enquanto os isolados LBM01, LBM03 e LBM06 foram capazes de manter a inibição durante 168 h. O isolado LBM06 revelou a maior porcentagem de inibição em todos os dois métodos de cultura utilizados.

Palavras-chave: Biocontrole; Fungo fitopatogênico; Bactéria da rizosfera.

Abstract

Bacteria from the genus *Bacillus* sp. have a high potential for the biological control of phytopathogenic fungi. Therefore, in the present research we proposed to evaluate the antagonistic capacity of *Bacillus* sp. isolates against the phytopathogenic fungus *Sclerotium* sp. The tests were performed using two methods (dual and modified dual), also using five *Bacillus* sp. isolates (LBM01, LBM02, LBM03, LBM04 and LBM06). Mycelial growth evaluations were performed on BDA culture medium. All experiments were performed in triplicate and the plates were incubated under a 12 h photoperiod at 28 ± 1 °C for 7 days. Radial growth of the pathogens was measured at the intervals of 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h. The percentage of inhibition was calculated using the equation: $I\% = [(C-T)/C] \times 100$. All *Bacillus* sp. isolates tested were able to inhibit the mycelial growth of *Sclerotium* sp. within 72 h, while isolates LBM01, LBM03 and LBM06 were able to maintain inhibition for 168 h. The isolate LBM06 showed the highest percentage of inhibition in all two culture methods used.

Keywords: Biocontrol; Phytopathogenic fungus, Rhizosphere bacteria.

Resumen

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* sp. tienen un alto potencial para el control biológico de hongos fitopatógenos. Por lo tanto, en la presente investigación nos propusimos evaluar la capacidad antagónica de los aislados de *Bacillus* sp. contra el hongo fitopatógeno *Sclerotium* sp. Las pruebas se realizaron utilizando dos métodos (dual y dual modificado), así como cinco aislados de *Bacillus* sp. (LBM01, LBM02, LBM03, LBM04 y LBM06). Las evaluaciones del crecimiento micelial se realizaron en medio de cultivo BDA. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las placas se incubaron bajo un fotoperíodo de 12 h a 28 ± 1 °C durante 7 días. El crecimiento radial de los patógenos se midió a intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación: $I\% = [(C-T)/C] \times 100$. Todos los aislados de *Bacillus* sp. probados fueron capaces de inhibir el

crecimento micelial de *Sclerotium* sp. em 72 h, enquanto que os isolados LBM01, LBM03 e LBM06 foram capazes de manter a inibição durante 168 h. O isolado LBM06 mostrou o maior percentual de inibição em todos os dois métodos de cultivo utilizados.

Palavras chave: Biocontrole; Fungo fitopatogênico; Bactérias da rizosfera.

1. Introdução

A produção de alimentos é afetada por bactérias, fungos e vírus fitopatogênicos, provocando perdas de 25 e 30% na produção anual (Wu et al., 2015). As doenças das raízes ocasionadas por fungos figuram como as principais causas de redução da produtividade das culturas por sua natureza contínua e devastadora. Os principais gêneros incluem *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Thielaviopsis* e *Verticillium* (Lopes & Michereff, 2018). A fim de controlar o prejuízo, são utilizados produtos químicos eficazes, porém prejudiciais para o meio ambiente e alguns organismos vivos (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Microorganismos como bactérias têm a capacidade de produzir compostos antimicrobianos que ajudam a competir por nutrientes e espaço em um determinado habitat, os mesmos podem ser utilizados como bioinoculantes no controle de fitopatogênicos, sendo uma estratégia de controle mais barata que a utilização de produtos químicos, além de ter efeitos positivos ao promover o crescimento de plantas (Rahman et al., 2018; Cesa-Luna et al., 2020). Os gêneros bacterianos mais estudados capazes de produzir estas substâncias inibitórias são *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia* e *Burkholderia* (Cesa-Luna et al., 2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* são produtores de uma ampla gama de compostos antagônicos, tendo um amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus fitopatogênicos. Estas bactérias provenientes da rizosfera do solo, também beneficia a planta ao promover seu crescimento, facilitar a absorção e utilização de nutrientes minerais e reduzir a ocorrência de doenças (Fira et al., 2018). A ação de biocontrole realizada pelo *Bacillus* sp. envolve dois mecanismos, um direto, ao produzir moléculas com propriedades antimicrobianas (surfactina, iturina e fengicina) e outro indireto, ativando a resistência sistêmica induzida (Melo et al., 2021).

Atividade antagônica de cepas de *Bacillus* sp. contra alguns fungos fitopatogênicos tem sido avaliada em algumas culturas como soja (Montino, 2021), ginseng (Durairaj et al., 2018) e amendoim (Xu et al., 2019), mostrando sua eficiência no biocontrole. Também espécies de *Bacillus* apresentam um alto potencial para o controle de algumas espécies do gênero *Sclerotium* como *S. rolfsii* (Chen et al., 2019; Ferreira et al., 2019; Xu et al., 2019), *S. cepivorum* (Pereira, 2021) e *S. sclerotiorum* (Sabaté, 2018). O controle biológico e o uso de promotoras de crescimento de plantas no futuro se tornarão uma demanda da agricultura (Fira et al., 2018). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antagônica *in vitro* de diferentes cepas de *Bacillus* sp. ao fungo fitopatogênico *Sclerotium* sp.

2. Metodologia

O experimento foi conduzido no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Tocantins, campus Gurupi. O fungo fitopatogênico utilizado foi *Sclerotium* sp. procedente da Micoteca do laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Tocantins, campus Gurupi. As bactérias utilizadas no experimento são parte da Coleção de *Bacillus* sp. (LBM01, LBM02, LBM03, LBM04 e LBM06) do laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Tocantins, campus Gurupi, provenientes de solos rizosféricos.

Para o início do experimento, *in vitro*, o fungo *Sclerotium* sp. foi replicado em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e os cinco isolados de *Bacillus* sp. em meio LBA (Luria-Bertani-Ágar), sob fotoperíodo 12 h a temperatura de 28±1 °C, por 3 dias. A capacidade dos isolados de inibir o crescimento de patógenos vegetais fúngicos (*Sclerotium* sp.) foi determinada em placas Petri de 90 mm com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

O primeiro método utilizado para fazer o confronto foi de dual. Para tal, um disco de ágar (5 mm) foi cortado de uma placa com crescimento ativo de *Sclerotium* sp. e colocado num lado da placa Petri. As bactérias foram inoculadas com uma alça oposta ao disco fúngico em cada placa (Rangeshwaran & Prasad, 2000). A técnica de dual modificada foi utilizada como segundo método. Nesse método, um disco micelial (5 mm) do fungo foi inoculado no centro da placa Petri e o isolado bacteriano foi semeado na placa a 3 cm do centro em quatro lados (Kumari et al., 2021).

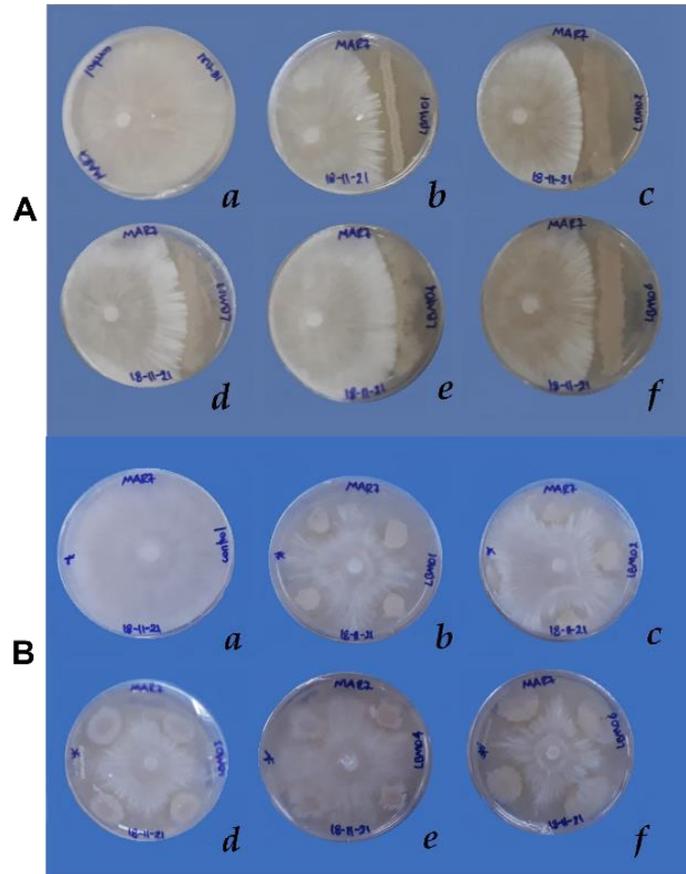
As placas inoculadas com fitopatógeno e sem bactérias foram utilizadas como controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e as placas foram incubadas sob fotoperíodo de 12 h a 28 ± 1 °C durante 7 dias. O crescimento radial dos patógenos foi medido nos intervalos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas; a porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte equação (Riungu et al., 2008): $I\% = [(C-T)/C] \times 100$, onde $I\%$ = porcentagem de inibição do crescimento micelial, C = crescimento radial do fungo na placa controle (mm) e T = crescimento radial do fungo na placa inoculada com bactérias (mm). Os tratamentos onde não obtiveram inibição de crescimento receberam valor igual a zero.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste DGC a $p=0,05$ usando o software InfoStat versão 2018, e apresentados num box-plot com a média e o erro padrão da média calculados utilizando-se o software GraphPad Prisma versão 9.

3. Resultados e Discussão

No presente experimento, o efeito antagônico dos cinco isolados de *Bacillus* sp. foi avaliado por dois métodos (dual e dual modificado) contra o fungo fitopatogênico *Sclerotium* sp., e observa-se que o fungo fitopatogênico cobriu mais do 50% da área das placas Petri de 90 mm de diâmetro dentro de 48 h na placa controle e conseguiu cobrir a área completa no intervalo de 72 h. Na triagem realizada pelo método dual, após 72 h se observa uma inibição de 24,4%, 26,2%, 26,7%, 31,1% e 33,9%, para os isolados LBM04, LBM03, LBM01, LBM06 e LBM02, respectivamente. Enquanto, utilizando o método dual modificado observa-se uma inibição de 30,9%, 49,4%, 50,0%, 54,3% e 55,0%, para os isolados LBM02, LBM03, LBM04, LBM01 e LBM06, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Interação in vitro entre isolados bacterianos e *Sclerotium* sp. na placa de meio BDA 72 horas após a incubação a 28 °C. **A)** Método dual, **B)** Método dual modificado. **a:** Controle; **b:** LBM01; **c:** LBM02; **d:** LBM03; **e:** LBM 04; e **f:** LBM06

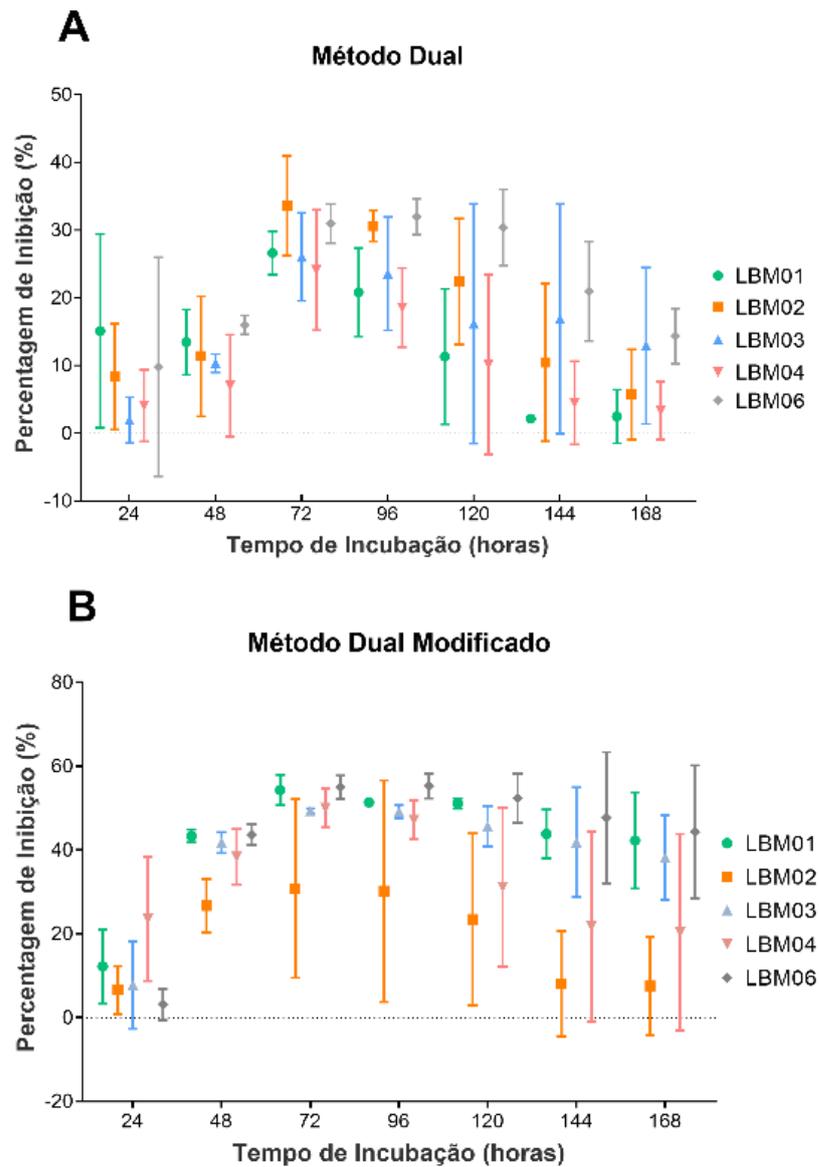


Fonte: Autores.

Além de analisar a porcentagem de inibição comparando os dois métodos utilizados, quando empregamos diferentes espécies do gênero *Bacillus* a capacidade de inibição vai diferir entre eles devido a seu comportamento e a produção de compostos antimicrobianos. Para os isolados de *B. subtilis* (LCB30) e *Bacillus* sp. (INV) a capacidade de inibição do crescimento micelial do fungo *S. rolfii* permite reduzir a colônia fúngica em 53,7% e 29,2%, respectivamente; enquanto os isolados *B. subtilis* (LCB45) e *Bacillus* sp. (BMH), apresentam menor capacidade de inibição de 13,5% e 21,5%, respectivamente, além de não diferir estatisticamente do controle (Ferreira de Sá et al., 2019)

Durante o tempo de avaliação da capacidade de inibição dos isolados de *Bacillus* sp., o efeito antagonístico dos isolados bacterianos no método dual modificada mostra porcentagens de inibição maiores do que o método dual. Algo semelhante ocorre com Kumari et al., (2021), onde o potencial antagonístico estimado para todos os isolados bacterianos pelos diferentes métodos utilizados é diferente. Além disso, os isolados bacterianos de 24 h às 72 h exibem uma porcentagem crescente de inibição, depois das 72 h as bactérias são incapazes de manter a inibição do fungo, sendo mais eficientes às 72 e 96 h após a incubação (Figura 2).

Figura 2. Atividade antifúngica de isolados bacterianos (LBM01, LBM02, LBM03, LBM04 e LBM06). **A)** Método dual e **B)** Método dual modificado contra *Sclerotium* sp. (valores são expressos como média \pm SD).

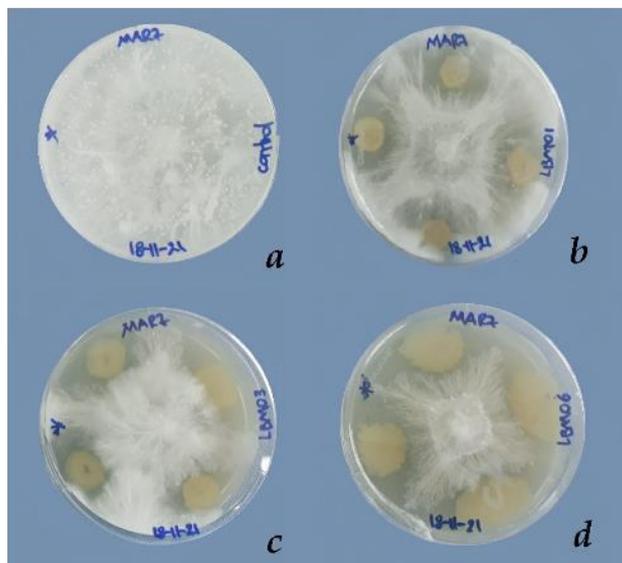


Fonte: Autores.

Tanto no método dual como no método dual modificado, o isolado LBM06 apresenta maior porcentagem de inibição entre os outros isolados e consegue manter essa inibição até o final do experimento (168 h) de 14,3% e 44,3%, respectivamente. No método dual modificado os isolados LBM01 e LBM03 apresentam altas porcentagens de inibição até o final do experimento (168 h) de 42,3% e 38,2%, respectivamente (Figuras 2 e 3).

É importante reconhecer a capacidade de inibição de bactérias do gênero *Bacillus*, isolados de *Bacillus* sp. (B19 e P12) e *B. amyloliquefaciens* (B14) mostrarem uma capacidade de inibição fúngica entre 60 e 100% contra isolados de *S. sclerotiorum* (Sabaté, 2018). Também uma cepa de *Bacillus velezensis* (LHSB1), se apresenta como com 93-98% de inibição do crescimento radial das hifas de *S. rolfisii*, além de exibir atividade antagonica contra outros seis fungos patogênicos do amendoim (Chen et al., 2019). Em testes em campo, um isolado da rizosfera do amendoim, *Bacillus pumilus* (LX11), mostrou atividades antimicrobianas significativas contra o *S. rolfisii*, alcançando mais de 65% (Xu et al., 2019).

Figura 3. Interação *in vitro* entre isolados bacterianos e *Sclerotium* sp. na placa de meio BDA (batata-dextrose-ágar) ao 168 horas após a incubação a 28 °C com método dual modificado. **a:** Controle; **b:** LBM01; **c:** LBM03; e **d:** LBM06.



Fonte: Autores.

Ao final do experimento dos cinco isolados de *Bacillus* sp. avaliados por dois métodos contra o fungo fitopatogênico *Sclerotium* sp., só alguns conseguiram manter o efeito de inibição as 168 h de incubação. A importância de utilizar as bactérias do gênero *Bacillus* reside no potencial de atividade antifúngica que as mesmas apresentam e em sua capacidade de produzir substâncias promotoras do desenvolvimento vegetal (Ocegueda-Reyes et al., 2020). Atualmente tem muitas pesquisas relacionadas a capacidade antagonista do gênero *Bacillus*, como Gholami et al. (2013), que relataram a atividade antagonista das bactérias endófitas *B. subtilis* subsp. *subtilis* e *B. subtilis* subsp. *spizizenii* maior que 60% contra *S. rolfsii*. Também, Kumari et al. (2021), onde demonstraram que cada cepa de *Bacillus* que avaliaram tinha sua capacidade antagonista característica contra o patógeno *Sclerotium rolfsii*, e consideraram utilizar as cepas de forma individual ou em combinação para a obtenção de um produto com melhor eficiência.

4. Conclusão

Nas condições em que o estudo foi realizado, todos os isolados de *Bacillus* sp. demonstraram ter capacidade de inibição fúngica ao reduzir o crescimento micelial de *Sclerotium* sp. em até 72 h, enquanto os isolados LBM01, LBM03 e LBM06 conseguiram manter a inibição até 168 h. O isolado LBM06 se apresentou como a maior percentagem de inibição nos métodos dual e dual modificado após 168 h. Portanto, estes isolados podem ser utilizados para como agente de biocontrole eficazes contra a *Sclerotium* sp. e outros fungos fitopatogênicos.

Agradecimentos

Aos programas de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e Produção Vegetal (PPGPV) da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi.

Referências

- Cesa-Luna, C., Baez, A., Quintero-Hernández, V., De La Cruz-Enríquez, J., Castañeda-Antonio, M. D., Muñoz-Rojas, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1): 140-154.
- Chen, L., Wu, Y. D., Chong, X. Y., Xin, Q. H., Wang, D. X., & Bian, X. (2019). Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(3): 803-813.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J. H., Chang, W. S., Park, Y. J., Senthilkumar, P., Choi, K. M., Lee, J. H., Oh, B. T. (2018). An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. *Biological Control*, 125: 138-146.
- Ferreira de Sá, M. N., Lima, J. S., Nascimento de Jesus, F., Perez, J. O., & Gava, C. A. (2019). Effect of *Bacillus* sp. and *Trichoderma* sp. in micelial growth of *Sclerotium rolfsii*. *Acta Brasiliensis*, 3(2): 79-81.
- Ferreira, M., Lima, J., Nascimento, F., Perez, J., & Gava, C. (2019). Efeito de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. no crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*. *Acta Brasiliensis*, 3(2): 79-81.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285: 44-55.
- Gholami, M., Khakvar, R., & Niknam, G. (2013). Introduction of some new endophytic bacteria from *Bacillus* and *Streptomyces* genera as successful biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(1): 122-130.
- Kumari, P., Bishnoi, S., & Chandra, S. (2021). Assessment of antibiosis potential of *Bacillus* sp. Against the soil-borne fungal pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(17).
- Lopes, U. P., & Michereff, S. J. (2018). Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. (1ª. Ed.): EDUFRPE. 208 p.
- Melo, T. A., Nascimento, I. T. V. S., & Serra, I. M. R. de S. (2021). The *Bacillus* genus applied to the biological control of plant diseases. *Research, Society and Development*, 10(9):e18110917817.
- Montino, S. P. (2021). Uso do *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole de fitopatogenos da cultura de soja. *Revista Multidisciplinar de Educacao e Meio Ambiente*, 2(3): 14.
- Ocegueda-Reyes, M., Casas-Solís, J., Virgen-Calleros, G., Gonzalez-Eguiarte, D., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2020). Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagonicas a *Sclerotium cepivorum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(1): 146-159.
- Pereira, A. (2021). Controle biológico de *Sclerotium cepivorum* mediado por *Bacillus spp.* na cultura do Alho (*Allium sativum*). Teses: graduação. Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos. Curitibanos, Santa Catarina, Brasil.
- Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267: 102-111.
- Rangeshwaran, R., & Prasad, R. (2000). Biological control of *Sclerotium* rot of sunflower. *Indian Phytopathology*, 53(4): 444-449.
- Riungu, G., Muthomi, J., Narla, R., Wagacha, J., & Gathumbi, J. (2008). Management of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol accumulation using antagonistic microorganisms. *Plant Pathology*, 7: 13-19.
- Sabaté, D. C., Pérez, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2018). Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research*, 211: 21-30.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., CiraChávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.
- Wu, L., Wu, H.-J., Qiao, J., Gao, X., & Borriss, R. (2015) Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of *Bacillus* Based Bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6:1395.
- Xu, M., Zhang, X., Yu, J., Guo, Z., Wu, J., Li, X., Chi, Y., & Wan, S. (2020). Biological control of peanut southern blight (*Sclerotium rolfsii*) by the strain *Bacillus pumilus* LX11. *Biological Science and Technology*, 30(5).