

Potencial antimicrobiano de bactérias promotoras de crescimento vegetal a fitopatógenos

Tauane Santos Brito^{1*}; Daniele Aline Portz²; Elisiane Inês Dall'Oglío Chaves²; Renan Pan¹; Kelly Thais Canello²

¹ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Candido Rondon, Paraná, Brasil.

² Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

^{1*} tauane-brito@hotmail.com

Resumo: As formas pelas quais as bactérias agem na planta são as mais diversas, dentre elas estão o fornecimento de substâncias que auxiliam no crescimento e desenvolvimento da cultura, como a fixação biológica de N, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de ácido indol-acético, além disso ainda podem atuar como antagonistas a fitopatógenos. Com isso, o presente trabalho teve por objetivo verificar o potencial antagônico de bactérias promotoras de crescimento vegetal à fitopatógenos. As estirpes, *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pantoea ananatis*, *Burkholderia ambifaria* e *Burkholderia* sp., foram testadas *in vitro*, utilizando-se o método das culturas pareadas. As espécies fúngicas utilizadas no experimento foram *Alternaria solani*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum lindemuthianum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo que utilizou-se um arranjo fatorial (5x6) com 4 repetições, os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. A bactéria *Burkholderia* sp. foi a estirpe que mais se destacou na inibição de crescimento fúngico, pois para todas as espécies fúngicas avaliadas se obteve percentual de inibição de crescimento, sendo que o maior valor de inibição foi para o fungo *C. lindemuthianum* (65,38%).

Palavras-chave: Atividade antagonista; bactérias associativas; controle alternativo.

Antimicrobial potential of plant growth promoting bacteria to phytopathogens

Abstract: There are many ways for the bacteria to act on the plant metabolism like the provision of elements that help on its development, the biologic fixation of N, phosphate solubilization, siderophores production and indoleacetic acid production besides they can also work as antagonists to phytopathogens. The present research aimed to verify the antagonistic potential of growth promoting bacteria to plant pathogens. The strains of *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pantoea ananatis*, *Burkholderia ambifaria* and *Burkholderia* sp., were tested *in vitro* using the paired crops method. Were used the following fungus species on the experiment *Alternaria solani*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum lindemuthianum*. The experimental design was completely randomized being used a factorial arrangement (5x6) with 4 repetitions and the data were submitted to variance analysis at 5% of probability and to the Tukey test at 5% of probability. The *Burkholderia* sp was the highlighted strain on the fungus growth inhibition because, for all the tested species of fungus, that had a highest percentage of inhibition being the *C. lindemuthianum* the most inhibited fungus (65,38%).

Keywords: Antagonist activities; associative bacteria; alternative control.

Introdução

Microrganismos podem ser caracterizados como promotores de crescimento pela sua ação no metabolismo da planta. Bactérias promotoras de crescimento são microrganismos capazes de produzir hormônio, vitaminas e fatores que promovam o crescimento das plantas (BALDANI e BALDANI, 2005).

Estas bactérias contribuem com o crescimento vegetal muitas vezes por mais de uma forma, como por exemplo, antagonismo a fungos patogênicos, produção de sideróforos, fixação

de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácidos orgânicos e ácido indol-acético, liberação de enzimas e indução de resistência a doenças (GLICK, 2012). Alguns gêneros vêm sendo estudados de maneira intensiva, dentre eles estão: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Zoogloea* (BABALOLA, 2010).

O potencial de microrganismos endofíticos na promoção de crescimento de plantas, bem como no controle de patogenias, podem ser explorados e obterem ganhos ambientais de extrema relevância, uma vez que ocorreria a redução na aplicação de defensivos agrícolas, tornando o sistema mais sustentável (SANTOS e VARAVALLO, 2011).

Em ensaio *in vitro* utilizando 4 espécies patogênicas da cana-de-açúcar, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Ceratocystis multianulata* e *Thielaviopsis* sp., e 5 estirpes bacterianas diazotróficas, *G. diazotrophicus*, *B. tropica*, *A. amazonense*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, Silva *et al.* (2013) obtiveram dados variáveis entre as estirpes bacterianas com relação à supressão fúngica. *B. tropica* suprimiu o crescimento de todos os isolados fúngicos, já a estirpe *G. diazotrophicus* inibiu apenas o crescimento do fungo *Ceratocystis multianulata*. Este comportamento diferenciado entre as estirpes bacterianas evidencia a produção de compostos variados entre as bactérias que irão atuar na inibição do crescimento fúngico.

Ikeda (2014), ao testar a atividade antifúngica *in vitro* de bactérias isoladas do sistema radicular do milho em doenças da cultura, *Alternaria* sp, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides*, *Cercospora* sp., *Bipolaris* sp. e *Diaporthe* sp., obteve uma maior inibição do crescimento fúngico quando utilizou o gênero *Burkholderia*. Esta maior inibição pode ocorrer por vários fatores, dentre estes, a produção de enzimas líticas, por parte das bactérias, causando a destruição dos componentes celulares dos fungos, mas também pode ocorrer pela competição por nutrientes.

Duarte *et al.* (2010), ao utilizar 42 isolados bacterianos obtidos do solo e testar contra 3 raças do fitopatógeno do milho *Colletotrichum sublineolum in vitro*, observaram que o potencial antagonista variou de 0 a 70%, evidenciando que alguns isolados são mais promissores que outros, além disso, o potencial antagonista também é dependente da raça do patógeno em questão.

Já Oliveira *et al.* (2011) utilizaram 10 isolados de *Bacillus* spp. em ação antagonista ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder; Hansen, em testes *in vitro*, e obtiveram inibições variando de 49,5% à 11,53%, evidenciando que apesar de testar espécies dentro do mesmo gênero é possível que ocorram diferenças amplas quanto a inibição de crescimento fúngico.

O presente trabalho teve por objetivo verificar o potencial antagônico de bactérias promotoras de crescimento vegetal à fitopatógenos, realizada *in vitro*, confrontando as estirpes bacterianas e fungos fitopatogênicos isolados de culturas variadas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Campus Toledo. Para avaliação do potencial antagônico foram utilizadas cinco estirpes bacterianas, *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Herbaspirillum seropedicae*, *Pantoea ananatis*, *Burkholderia ambifaria* e *Burkholderia* sp, em que cada estirpe constituiu um tratamento. As cepas foram gentilmente cedidas pela Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, e as mesmas, foram mantidas por sucessivas repicagens em meio sólido específico de isolamento, e incubadas em estufa a 28°C.

A avaliação do potencial do controle *in vitro*, das 5 espécies bacterianas contra 6 espécies de fitopatógenos, foi realizada através do método de culturas pareadas, que consiste na confrontação direta dos microrganismos em meio de cultura. Os fitopatógenos foram cedidos pelo laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Marechal Cândido Rondon.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), utilizando-se 5 estirpes bacterianas (*A. brasilense*, *H. seropedicae*, *P. ananatis*, *B. ambifaria*, *Burkholderia* sp.) e 6 espécies fúngicas (*A. solani*, *Fusarium* sp., *R. solani*, *M. phaseolina*, *B. sorokiniana* e *C. lindemuthianum*), com 4 repetições, formando assim um esquema fatorial 5x6, totalizando 120 placas de Petri.

As espécies fúngicas utilizadas para o experimento foram *Alternaria solani*, proveniente da cultura do tomate, *Fusarium* sp., proveniente da cultura do milho, *Rhizoctonia solani*, proveniente da cultura da soja, *Macrophomina phaseolina*, proveniente da cultura do feijão, *Bipolaris sorokiniana*, proveniente da cultura do trigo, e *Colletotrichum lindemuthianum*, proveniente da cultura do feijão.

Um disco de micélio do fitopatógeno, de 5 mm de diâmetro, foi inserido no centro da placa de Petri, contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Em quatro pontos equidistantes do

disco do micélio, foram adicionados 10 µL de suspensão de cada bactéria testada como provável antagonista. Para preparação das suspensões foram alçadas as colônias bacterianas que estavam em meio seletivo conforme cada espécie, e estas foram suspensas em solução salina 0,9%.

Placas contendo apenas o fitopatógeno foram utilizadas como controle. Após sete dias de incubação à temperatura de 25°C ± 2 em estufa tipo BOD no escuro contínuo, mediu-se com paquímetro o diâmetro do micélio do fitopatógeno, na presença e ausência dos antagonistas. A inibição dos fitopatógenos foi estimada, utilizando-se a seguinte expressão:

Zona de inibição, %, (ZI) = $(N1 - N2) / N1 \times 100$, sendo N1 o raio do micélio encontrado na ausência do antagonista e, N2, crescimento do micélio na presença do antagonista (Duarte *et al.*, 2010).

Os resultados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, e ao ocorrer diferença significativa entre os tratamentos, foi aplicado teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software CoSat (COHORT SOFTWARE, 2003).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão representados os resultados obtidos na avaliação da ação antagonônica das bactérias contra fungos fitopatogênicos. Por ter ocorrido interação entre as variáveis analisadas na análise de variância, procedeu-se desdobramento da análise estatística com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ao observar os dados contidos na tabela 1, com relação à bactéria *A. brasilense*, nota-se que ocorreu redução do crescimento o fungo *B. sorokiniana* em 51,78%, sendo o fungo com maior zona de inibição para a bactéria *A. brasilense*, diferindo de todos os demais. Ocorreu ausência de inibição apenas para o fungo *M. phaseolina*, o qual não diferiu estatisticamente dos fungos *A. solani* e *C. lindemuthianum*.

Para a bactéria *H. seropedicae*, a maior média para zona de inibição foi encontrada para o fungo *B. sorokiniana* (46,43%), este não diferiu estatisticamente dos fungos *Fusarium* sp. e *R. solani*, contudo, não ocorreu inibição alguma para o fungo *M. phaseolina*. Para a bactéria *P. ananatis*, a maior média para zona de inibição foi encontrada para o fungo *B. sorokiniana* (54,17%), sendo que este não diferiu estatisticamente dos fungos *Fusarium* sp. e *C. lindemuthianum*, porém sem qualquer inibição para o fungo *M. phaseolina*. Para a bactéria *B. ambifaria*, o fungo que apresentou a maior zona de inibição de crescimento foi *B. sorokiniana* (39,88%), sendo que este não teve ação sobre *A. solani* e *M. phaseolina*.

Pesquisas diversas têm identificado como bactérias com potencial de promover crescimento podem atuar na inibição de organismos patogênicos (IKEDA, 2014; OLIVERIA *et al.* 2011; DUARTE *et al.* 2010). Essa característica se dá por motivos variados, em destaque a indução de resistência, onde a planta, ao ser infectada, já promove a produção de compostos que atuam no processo de defesa vegetal, como produção de lignina visando aumentar a resistência da parede celular (STANGARLIN e LEITE, 2008).

Existe ainda, o fato de que, no organismo vegetal esses organismos, benéficos ao desenvolvimento da planta, ocupam sítios de infecção geralmente utilizados pelo fitopatógenos, reduzindo assim as formas de entrada dos microrganismos patogênicos no organismo vegetal saudável e sem ferimentos (STANGARLIN e LEITE, 2008).

Tabela 1 - Resultados obtidos no teste de ação antagônica das bactérias contra fungos fitopatogênicos variados, resultados expressos em percentual de inibição do crescimento das estruturas fúngicas *in vitro*.

Patógeno	ZONA DE INIBIÇÃO (%)									
	<i>A. brasilense</i>		<i>H. seropedicae</i>		<i>P. ananatis</i>		<i>B. ambifaria</i>		<i>Burkholderia</i> sp.	
<i>A. solani</i>	4,17	abCD	5,55	abB	13,89	abBC	0,00	bC	25,00	aB
<i>Fusarium</i> sp.	26,67	aBC	23,33	aAB	35,83	aAB	18,33	aB	45,00	aAB
<i>R. solani</i>	27,84	abB	17,04	bAB	13,07	bBC	18,18	bB	53,41	aA
<i>M. phaseolina</i>	0,00	bD	0,00	bB	0,00	bC	0,00	bC	59,66	aA
<i>B. sorokiniana</i>	51,78	aA	46,43	aA	54,17	aA	39,88	aA	61,90	aA
<i>C. lindemuthianum</i>	17,31	bcBCD	9,62	cB	38,46	bA	21,15	bcB	65,38	aA

* Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si nas linhas. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si estatisticamente nas colunas. Fonte: o autor.

Para a bactéria *Burkholderia* sp., o fungo que apresentou maior zona de inibição de crescimento foi *C. lindemuthianum* (65,38%), sendo que ocorreu diferença significativa apenas para o fungo *A. solani*.

O fungo *B. sorokiniana* foi o que apresentou inibição do crescimento com utilização das bactérias de todas em estudo, com percentual de inibição variando de 39,88% a 61,90%. A bactéria que apresentou maior potencial de supressão dos fitopatógenos estudados foi a

Burkholderia sp (Figura 1). Ikeda (2014), ao realizar teste de produção de enzimas com cepa de *Burkholderia* sp., detectou que esta cepa originou resultados positivos para 6 testes, dentre eles produção de sideróforos, celulase, lipase, pectinase, protease e urease, os quais seriam indicativo de que, possivelmente, este gênero seria promissor para utilização como controle biológico.

Figura 1 - Ação antagonica da bactéria *Burkholderia* sp. em relação ao fungo *B. sorokiniana* (a), da bactéria *Burkholderia* sp. em relação ao fungo *R. solani* (b) e da bactéria *Pantoea ananatis* em relação ao fungo *Fusarium* sp.(c).



Como foi observado por Oliveria et al. (2011), espécies de bactérias dentro de um mesmo gênero podem variar em respostas para supressão de crescimento fúngico, sendo que ao testar a 10 isolados de *Bacillus* spp. em ação antagonista ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder; Hansen, em testes *in vitro*, obtiveram variações de resposta entre 49,5% e 11,53%. O que corrobora com o presente trabalho, uma vez que ocorreram amplas diferenças na supressão do crescimento fúngico pra as bactérias *B. ambifaria* e *Burkholderia* sp. apesar de pertencerem ao mesmo gênero. O que evidencia que há produção de compostos variados entre as bactérias que irão atuar na inibição do crescimento fúngico (SILVA et al., 2013).

A inibição de crescimento fúngico de espécies variadas, não só daquelas que assolam as culturas de um mesmo gênero ou mesmo família, é de suma importância. Pois ao realizar revisão de estudos que abordavam antagonismo bactérias endofíticas e fungos fitopatogênicos,

Mariano et al. (2004) relataram que certos grupos de organismos podem beneficiar mais de uma cultura. Este fato tornou-se evidente no presente trabalho, uma vez que as estirpes bacterianas caracterizadas pelo estudo em espécies da família Poaceae, mostraram supressão para espécies fúngicas de outras famílias.

Conclusão

As bactérias contribuíram para a redução do crescimento fúngico. A bactéria *Burkholderia* sp. foi a estirpe que mais se destacou na inibição de crescimento fúngico.

Referências

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 11, p. 1559-1570, 2010.

BALDANI, J. I.; BALDANI V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants : special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, 549–579, 2005.

COHORT SOFTWARE. **CoStat**. Monterey, California. 2003.

DUARTE, E. S.; ASSIS, N. R. F.; CHICATA, F. F. S. L.; COSTA, R. V.; VIANA, J. H. M.; MARRIEL, I. E. Prospecção de comunidade bacteriana para biocontrole de *Colletotrichum sublienum* agente causal da antracnose no sorgo. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 28, 2010, Goiânia. CD-Rom. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, p. 785 - 789, 2010.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, Canadá, v. 2012, p. 1–15, 2012.

IKEDA, A. C. **Bioprospecção e Identificação de Bactérias Isoladas de Raízes de Milho (*Zea mays* L.) para Promoção de Crescimento Vegetal e Controle Biológico**. 2014. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, n. 1, p. 89-111, 2004.

OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, M. S. B. S.; LIMA, O. D. R.; ROCHA, E. R. C.; SANTOS, L. V. S.; RODRIGUES, A. A. C. Avaliação in vitro do antagonismo de *Bacillus* spp. a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*. **Cadernos de Agroecologia, Fortaleza**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SILVA, P. R. A.; DRECHSEL, M. M.; SOARES, C. P.; VIDAL, M; S.; BALDANI, J. I. Efeito antagônico de bactérias diazotróficas contra fungos patógenos de cana-de-açúcar. In: Semana Científica Johanna Dobereiner, 12, 2013. **Anais...** Anais da Semana Científica Johanna Dobereiner, 2013.

STANGARLIN, J.R.; LEITE, B. Alterações fisiológicas na suscetibilidade. In PASCHOLATI, S.F., LEITE, B., STANGARLIN, J.R., *et al.* **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. 1ed. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 177-225.