

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

POTENCIAL ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS NO CRESCIMENTO DO FUNGO CAUSADOR DA MURCHA-DE-ESCLERÓCIO (*Sclerotium rolfsii*)

Pedro Henrique de Paula, Gabriel Mendes Ribeiro, Vanessa Sessa Dian, Wilian Rodrigues Ribeiro, Dalila da Costa Gonçalves, Willian Bucker Moraes, André da Silva Xavier.

Universidade Federal do Espírito Santo - Campus Alegre, Alto Universitário, s/n Guararema, Alegre - ES, 29500-000- Brasil, pedro1901ze@gmail.com, gabrielmendes0069@gmail.com, vanessasessa2@gmail.com, wilianrodrigues@msn.com, dalilant@hotmail.com, willian.fito@gmail.com, andre.s.xavier@ufes.br

Resumo

O controle biológico tem se mostrado uma estratégia promissora para combater doenças agrícolas causadas pelo fungo *Sclerotium rolfsii*. Neste estudo, investigamos o potencial de bactérias antagonistas, para inibir o crescimento do patógeno em placas de Petri. A metodologia envolveu o isolamento do *Sclerotium rolfsii* e sua reativação em meio de cultura BDA. Foram testadas as bactérias do acervo laboratorial da UFES-Campus de Alegre, SS1, SS2 e ANL, em placas contendo micélio do fungo. A avaliação foi feita após 8 dias, medindo o crescimento micelial do *Sclerotium rolfsii*. Os resultados indicaram que a bactéria SS1 apresentou forte potencial de inibição, tornando-se uma candidata promissora para o controle biológico desse fitopatógeno. Tal resultado pode fomentar o desenvolvimento de novas pesquisas e oferecer alternativas sustentáveis para o manejo de doenças agrícolas que promovam a segurança alimentar e ambiental.

Palavras-chave: Controle biológico. Fitopatógeno. Placas de Petri. Segurança alimentar.

Área do Conhecimento: Engenharia agrônoma

Introdução

O controle biológico tem se mostrado uma estratégia promissora para combater doenças agrícolas, proporcionando uma alternativa sustentável e eficaz em relação aos métodos convencionais de controle de pragas e patógenos. Dentre as inúmeras ameaças fitopatogênicas que assolam as plantações, o fungo *Sclerotium rolfsii*, conhecido popularmente como "mofo branco", destaca-se como um patógeno de ampla distribuição mundial, causando grandes prejuízos econômicos em diversas culturas.

Segundo Auler *et al.* (2013) o fungo *Sclerotium rolfsii* é um importante fitopatógeno habitante do solo, responsável por podridões do colo e raízes, murcha e tombamento de plântulas em inúmeras espécies economicamente importantes. Esse patógeno tem a capacidade de sobreviver por longos períodos no solo, formando estruturas de resistência chamadas escleródios, o que dificulta seu controle e contribui para sua disseminação. Apresenta extensa gama de hospedeiros, cerca de 200 espécies pertencentes a quase 100 famílias botânicas, incluindo dicotiledôneas e 7 monocotiledôneas, distribuindo-se em todas as regiões agrícolas do Brasil (MARCUIZZI; SCHULLER, 2014).

Embora o uso de fungicidas químicos seja comum no manejo desse patógeno, ele pode levar a problemas ambientais, resistência dos fungos e riscos à saúde humana (CAMPANHOLA *et al.*, 2003). Diante dessas questões, o controle biológico surge como uma alternativa mais sustentável e compatível com a agricultura moderna.

Estudos recentes têm revelado o potencial de microrganismos no controle do *Sclerotium rolfsii*. Em uma pesquisa conduzida por Cunha *et al.* (2023), foi demonstrado que cepas do fungo *Trichoderma* spp. apresentaram forte atividade antagonista contra o patógeno, inibindo seu crescimento e esporulação. Da mesma forma, a pesquisa de Hannan *et al.* (2012) identificou que bactérias fixadoras de nitrogênio, como as do gênero *Rhizobium*, não só promovem o crescimento das plantas através da fixação biológica do nutriente, mas também demonstram capacidade de antagonismo contra patógenos

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

como *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolsii*, contribuindo para combater as podridões causadas pelo parasitismo

O controle biológico oferece vantagens significativas, como a baixa toxicidade aos seres humanos e ao meio ambiente, além de não deixar resíduos nos produtos agrícolas (BETTIOL *et al.*, 2009). Outro aspecto relevante é a preservação da biodiversidade, uma vez que o uso de fungicidas químicos pode afetar negativamente outras formas de vida, como insetos benéficos e polinizadores. Dessa forma, o controle biológico desponta como uma abordagem altamente promissora para mitigar os danos causados pelo *Sclerotium rolsii* nas culturas agrícolas. A busca por microrganismos eficazes no combate a esse patógeno pode representar um avanço significativo na agricultura, proporcionando soluções mais sustentáveis e econômicas para os agricultores. Frente ao exposto, objetivou-se com essa pesquisa encontrar resultados positivos utilizando-se bactérias com potencial antagonista, para inibir o crescimento do fungo *Sclerotium rolsii* em meio de cultura BDA, vertido em placas Petri.

Metodologia

O presente trabalho foi executado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Alegre-ES, no Laboratório de Microbiologia e também os recursos disponíveis no Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) e Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA) vinculados a esta instituição.

O isolado fúngico de *Sclerotium rolsii* foi obtido do acervo de fungos do BIOTA, em forma de escleródios, demandando assim uma etapa de reativação dos mesmos. Esse procedimento, executado em câmara de fluxo laminar, foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), sendo distribuídos 3 ou 4 escleródios por placa, mantidas em estufa incubadora BOD, com temperatura regulada a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, até germinarem e colonizarem a área da placa. Após este período, o fungo foi repicado, em câmara de fluxo laminar, em novas placas com o mesmo meio de cultura, por meio da transferência de disco de micélio obtidos com auxílio de furador de rolhas apresentando diâmetro de 6,35 mm e então mantido até a utilização no preparo do experimento, onde era novamente repicado sob as mesmas condições e utilizado na montagem dos experimentos com período de crescimento entre 48 e 72 horas. Os 3 isolados bacterianos avaliados (SS1, SS2 e ANL) foram gentilmente cedidos por membros do BIOTA, pois já haviam sido realizado testes anteriores a este no presente artigo.

Avaliação do potencial antagonista

O ensaio para avaliação do potencial antagonista foi realizado utilizando como tratamentos os isolados SS1, SS2 e ANL além de um controle negativo, sendo realizada 5 repetições para cada tratamento.

A montagem do experimento foi feita em câmara de fluxo laminar, para cada repetição, de cada tratamento, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram adicionados um disco de micélio do fungo apresentando crescimento de 48 a 72 h, obtido com auxílio de furador de rolha com diâmetro de 6,35 mm e transferido para a placa com auxílio de alça de platina devidamente esterilizada, além de 4 alíquotas (5 µL cada) de suspensão bacteriana com concentração ajustada para OD600=0,6, a partir de crescimento bacteriano em meio Caldo Nutriente, mantido overnight em incubadora tipo shaker regulada para condição de 30°C ± 2°C e 160 rpm, sendo realizada com auxílio de micropipeta e ponteiros de 200 µL. As características deste ensaio são similares ao utilizados por Xiong *et al.* (2015) para isolamento e caracterização de cepas bacterianas antagonistas.

Visando uniformizar a distribuição do disco de micélio e das alíquotas de suspensão bacteriana, foi utilizado um gabarito, para todos os tratamentos. No tratamento relativo ao controle negativo, o mesmo procedimento foi realizado, sendo adicionado água destilada esterilizada em substituição à suspensão bacteriana.

As placas, devidamente identificadas por meio de etiquetas, foram dispostas em estufa incubadora BOD, com temperatura regulada de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, sendo mantidas até constatada a colonização total pelo fungo das placas relativas ao controle negativo. A avaliação deste ensaio foi realizada por meio do monitoramento do crescimento radial do micélio fúngico, realizando-se após 8 dias de crescimento, considerando as duas retas diagonais hipotéticas que cortam os pontos de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

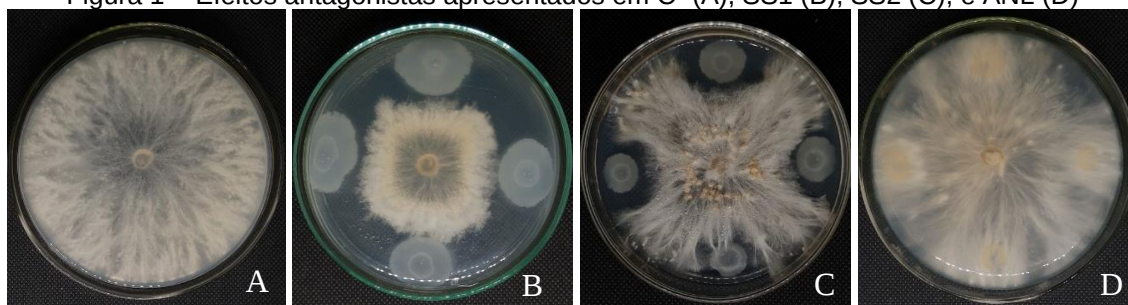
inserção das alíquotas da suspensão bacteriana, sendo realizado com auxílio de paquímetro digital, utilizando milímetros como unidade de medida.

Os dados foram adicionados à planilha do Excel, para posterior tratamento e realização de análises estatísticas. O tratamento dos dados envolveu a conversão da medida do crescimento micelial fúngico para dados relativos ao antagonismo bacteriano, obtida a partir do diâmetro padronizado das placas, sendo subtraído os valores referentes ao crescimento micelial e o diâmetro do disco de micélio utilizado.

Resultados

Os efeitos antagonistas entre bactérias e fungos referem-se às interações competitivas ou inibitórias que ocorrem entre esses microorganismos. Em algumas situações, bactérias e fungos podem competir por recursos ou espaço, levando a efeitos adversos para um ou ambos os grupos. A figura 1 demonstra os efeitos antagonistas das bactérias SS1, SS2 e ANL no crescimento do fungo causador da murcha-de-esclerócio (*sclerotium rolfii*).

Figura 1 - Efeitos antagonistas apresentados em C- (A), SS1 (B), SS2 (C), e ANL (D)

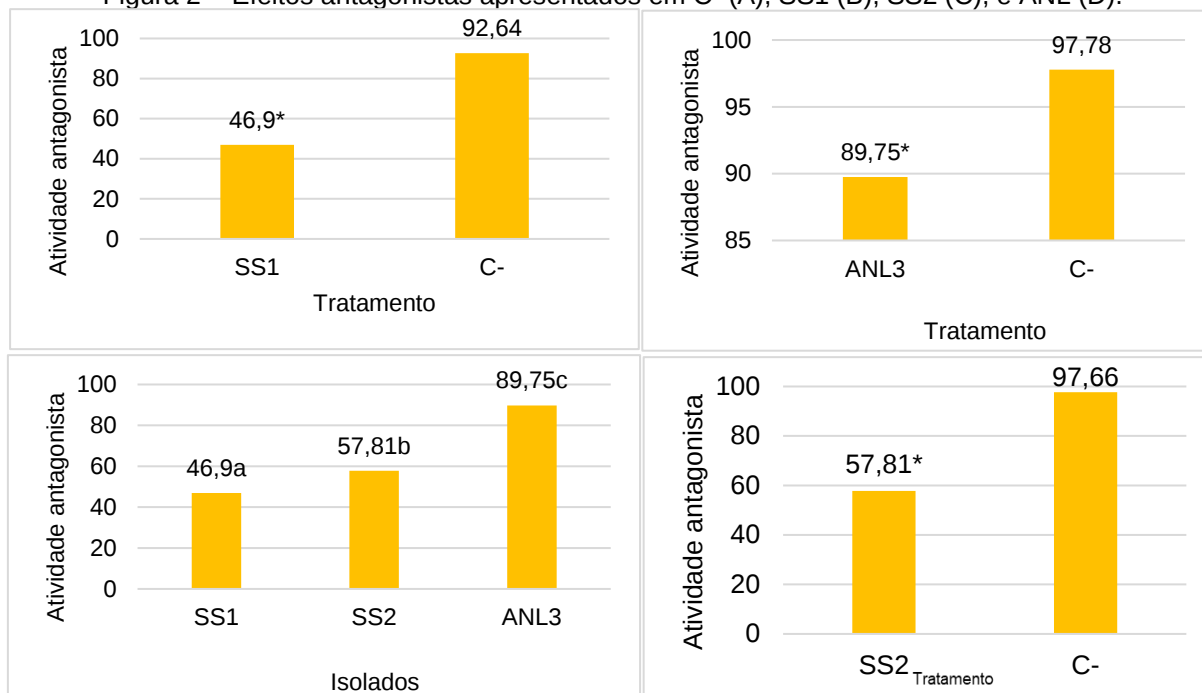


Fonte: O Autor

Após o tempo de incubação em BOD e coleta dos dados, foi realizado a conversão da medida do crescimento micelial fúngico para dados relativos ao antagonismo bacteriano, obtida a partir do diâmetro padronizado das placas, sendo subtraído os valores referentes ao crescimento micelial e o diâmetro do disco de micélio utilizado. Pela análise de variância, foi possível verificar que as cepas testadas apresentaram atividade inibitória contra o *sclerotium rolfii* *in vitro* significativamente ($p < 0,05$). Os isolados SS1 e SS2 apresentaram um maior efeito inibitório contra o patógeno testado quando comparado ao controle negativo. As cepas também foram estatisticamente diferentes entre si, podemos dizer com base em nossas análises que o isolado SS1 e SS2 são os mais promissores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2 - Efeitos antagonistas apresentados em C- (A), SS1 (B), SS2 (C), e ANL (D).



Fonte: O Autor

Discussão

Estudos têm enfatizado o potencial de bactérias antagonistas, como as pertencentes aos gêneros *Bacillus*, em inibir o crescimento e a esporulação de fitopatógenos, incluindo o *Sclerotium rolfsii* (ABREU *et al.*, 2022). Essas bactérias possuem a capacidade de produzir metabólitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas e outros compostos bioativos que atuam na supressão do crescimento do fungo fitopatogênico (MILAGRE *et al.*, 2017).

Os resultados mostraram que a bactéria SS1 teve um bom poder de inibição no crescimento do fungo *Sclerotium rolfsii* em placa de Petri, com uma redução significativa no crescimento micelial quando comparada às demais bactérias testadas. Esse resultado está alinhado com estudos que evidenciam a capacidade de alguns microrganismos, como os pertencentes ao gênero *Trichoderma*, em inibir o crescimento de *Sclerotium rolfsii* e outros fitopatógenos (ISAIAS, 2014). Esses fungos antagonistas são conhecidos por produzirem metabólitos secundários com atividade antifúngica, contribuindo para a redução da incidência de doenças em plantas.

A eficácia da bactéria SS1 em conter o crescimento do *Sclerotium rolfsii* também sugere que sua ação pode ser mediada por mecanismos de competição e/ou antibiose, onde a bactéria produz substâncias que inibem o crescimento do fungo (REIS *et al.*, 2014). Esse tipo de antagonismo tem sido amplamente explorado como uma alternativa ecologicamente correta para o controle de doenças em culturas agrícolas, minimizando o uso de fungicidas químicos e seus impactos negativos no meio ambiente.

Em relação à bactéria SS2, embora tenha apresentado potencial de inibição, não conseguiu conter totalmente o crescimento do fungo, porém o seu percentual de inibição foi significativo quando comparado ao teste controle. Esse resultado pode ser explicado pela diversidade de fatores que influenciam a interação entre bactérias e fungos fitopatogênicos. Diferenças na produção de metabólitos antifúngicos, velocidade de crescimento e adaptação ao ambiente podem afetar a eficácia do antagonismo (MEDRADO, 2019).

A bactéria ANL3, inicialmente vista como uma promissora candidata para a inibição do fungo, não apresentou resultados positivos na contenção do crescimento do *Sclerotium rolfsii*, comportando-se de forma semelhante ao controle negativo e bem inferior às demais cepas. Esses resultados podem estar

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

relacionados à especificidade do mecanismo de ação da bactéria contra o fungo, ou mesmo a possíveis interações competitivas entre os microrganismos no ambiente de cultivo.

No contexto da agricultura sustentável, a pesquisa com bactérias antagonistas, como a SS1, é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias inovadoras e eficientes no controle de doenças fitopatogênicas. A utilização de bactérias antagônicas no manejo integrado de doenças pode reduzir a dependência de fungicidas químicos, mitigar o desenvolvimento de resistência dos fitopatógenos e promover uma produção agrícola mais segura e ecologicamente equilibrada (MARIANO., 2004).

Conclusão

A bactéria SS1 apresentou um poder significativo de inibição no crescimento do fungo *Sclerotium rolfsii*, destacando-se como uma candidata promissora para o controle biológico. Esses resultados indicam o potencial das bactérias antagônicas no manejo sustentável de doenças fitopatogênicas, proporcionando uma alternativa mais segura e sustentável, quando comparada aos fungicidas químicos tradicionais. A pesquisa contribui para o avanço da fitopatologia, incentivando futuros estudos para ampliar o espectro de controle biológico e aprimorar a eficiência das estratégias de manejo integrado de doenças em culturas agrícolas. Estudos adicionais sobre os mecanismos de ação das bactérias e a aplicação em condições de campo são necessários para validar sua eficácia no cenário agrícola real, impulsionando a agricultura sustentável e a segurança alimentar.

Referências

ABREU, L. P. S.; BERBERT, P. A.; DE SOUZA TEODORO, C.E.; MARTINAZZO, A. P. Alternativa sustentável de uso da *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, 2022, 16.1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18316/rca.v16i1.8339>. Acesso em: 18 jul. 2023.

AULER, A. C. V.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* a *Sclerotium rolfsii* nas culturas do feijoeiro e soja. **Revista Agro Ambiente**, v. 7, n. 3, p. 359-365, 2013.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. AB. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2009, 2009. Disponível em: <https://bibliodigital.unijui.edu.br:8443/xmlui/bitstream/handle/123456789/2353/Biocontrole%20de%20doen%C3%A7as%20de%20plantas.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 jul. 2023.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2003., 2003. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/11706>. Acesso em: 18 jul. 2023.

CUNHA, A. **Uso de *Trichoderma* spp. no controle da incidência da podridão-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2023. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/3935>. Acesso em: 30 ago. 2023.

HANNAN, M. A.; HASAN, M. M.; HOSSAIN, I.; RAHMAN, S. M. E.; ISMAIL, A. M.; DEOG-HWAN, O. Integrated management of foot rot of lentil using biocontrol agents under field condition. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 883-888, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/S-M-E-Rahman/publication/224949559_Integrated_Management_of_Foot_Rot_of_Lentil_Using_Biocontrol_Agents_under_Field_Condition/links/5a4662d4aca272d2945ea1c2/Integrated-Management-of-Foot-Rot-of-Lentil-Using-Biocontrol-Agents-under-Field-Condition.pdf. Acesso em: 19 jul. 2023.

ISAIAS, C.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium*

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

dahliae. **Summa Phytopathologica**, 2014, 40: 34-41. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052014000100005>. Acesso em: 19 jul. 2023.

MARCUZZO, L. L.; SCHULLER, A. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 281-283, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1951>. Acesso em: 16 de jul. 2023.

MARIANO, R. L. R.; DA SILVEIRA, E. B.; DE 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 Agrônômica**, 2004, 1: 89-111. Disponível em: <https://journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/70>. Acesso em: 18 jul. 2023.

MEDRADO, P. H. S. **Fungos de solo no controle biológico de fitopatógenos**. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/204464>. Acesso em: 16 jul. 2023.

MILAGRE, L. P. **Caracterização de metabólitos secundários produzidos por isolados do gênero *Streptomyces* com atividade contra fungos fitopatogênicos**. 2017. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/189980>. Acesso em: 22 jul. 2023.

REIS, M. T. **Identificação e avaliação do potencial de uso de isolados de *Trichoderma* contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii***. 2014. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/18173>. Acesso em: 18 jul. 2023.

XIONG, H.; LI, Y.; CAI, Y.; CAO, Y.; WANG, Y. **Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* JK6 and identification of its lipopeptides surfactin for suppressing tomato bacterial wilt**. RSC Advances, 5(100), 82042–82049. 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/ra/c5ra13142a/unauth#!divCitation>. Acesso em: 18 jul. 2023.

Agradecimentos

Ao Centro de Ciências Agrárias Engenharias, ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, nas dependências dos quais os experimentos ocorreram, ao Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental (BIOTA), o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).