

PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE CONTROLE BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES ENTEROBACTER SPP. E BACILLUS SPP., BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DAS SEMENTES DE CACAU (THEOBROMA CACAO L.)

Eliane da Silva da Cruz¹Ana Cibelle Tavares Leal², Brenda Silva de Lima³, Raquel Soares Casaes Nunes⁴

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, elianecruz119@gmail.com;

² Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, cibelleleal.ufra@gmail.com;

³ Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, brendz93@gmail.com;

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia(UFRA), Belém, Pará, Brasil, raquel.nunes@ufra.edu.br

Palavras-chave: bioproduto, biocontrole, bactérias endofíticas, fitopatógeno

INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos em sistemas agroecológicos tem sido cada vez mais empregada no controle biológico de doenças de plantas, devido à crescente preocupação da sociedade com o uso excessivo de agrotóxicos, contaminação da cadeia alimentar e a pouca eficiência do controle químico para a fusariose LIMA et al. [1].

Para a redução desses fitopatógenos, são investigados métodos alternativos de controle biológico, com enfoque no uso de microrganismos endofíticos LUDWIG; MOURA; GOMES, [2]. “Esses microrganismos vivem no interior das plantas e são encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar doenças ou a produção de estruturas externas visíveis as plantas” (ASSUMPÇÃO et al., apud AZEVEDO et al., [3], ou seja, em condições ambientais adequadas vivem em total equilíbrio com a planta, podendo colonizar o mesmo nicho dos fitopatógenos e, assim, proporcionar proteção para a planta (POLONIO et al., [4].

Os maiores estudos foram realizados em espécies endofíticas de *Enterobacter* spp. e *Bacillus* spp. com ação antagonista em fungos fitopatogênicos (LUDWIG; MOURA; GOMES, [2]. Essas bactérias por sua vez, agem por antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência, podendo estar presentes no solo, rizosfera ou endofiticamente nos tecidos vegetais (HERRERA et al., [5].

Neste sentido, o estudo fomenta discussões sobre a importância da padronização de metodologia para biocontrole com a utilização das bactérias endofíticas (249.3 *Enterobacter hormaechei* /251.4 *Bacillus thuringiensis*) aos fungos endofíticos (*Geotrichum candidum* e *Galactomyces geotrichum*) e com potencial fitopatogênicos (Ascomycota sp.)

Objetivo do trabalho foi padronizar metodologia de biocontrole com isolados bacterianos endofíticos do cacau o cacau (*Theobroma Cacao L.*), na região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo é uma abordagem investigativa e experimental, com informações obtidas de isolados conduzidos no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal Rural da Amazônia UFRA e Laboratório de Proteção das Plantas na UFRA. Neste também, foram obtidas a coleção de isolados das espécies dos fitopatógenos e das bactérias endofíticas.

A elaboração dos meios de cultura foram realizados no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular no ano de 2022, por sete dias. As células dos isolados testados, foram plaqueadas nas placas de Petri descartáveis de 8 ml, 25 ml e 50ml. Para as bactérias o meio de cultivo utilizado foi Mueller-Hinton Ágar (MHA) concomitantemente com água destilada (AD) e para os fungos o meio de cultivo utilizado foi Sabouraud (Sabouraud Dextrose Ágar-SDA) juntamente com água destilada (AD).

Desta maneira, com o auxílio de alças estéreis descartáveis foram incubadas na estufa BDO, a 30°C por 72 horas no os isolados bacterianos (249.3/251.4) e os isolados fúngicos (110c3, 176c5, 112c2), ambos com fotoperíodo de 12h de luz / 12h de escuro. Assim, após 72h de ativação, os isolados bacterianos foram submetido a identificação da coloração Gram.

Em seguida, após o período de incubação os isolados “pescados” com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis descartáveis e acrescidos em conjunto, espaçados entre si em 40 mm, seguindo em lados opostos de placas de Petri descartáveis sobre meio de cultivo. Em seguida, as placas foram incubadas a 30° C na estufa BDO por 72 horas, com fotoperíodo de 12h de luz/ 12h de escuro.

Além disso, as interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. [6], e o crescimento do fitopatógeno foi medido utilizando a média em centímetros entre as duas distâncias entre o fungos e as bactérias.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram utilizados três isolados fúngicos *Galactomyces geotrichum* (código da placa nº 110C3), *Geotrichum candidum* (código da placa nº 176C5) e *Ascomycota spp.* (código da placa nº 112C2) com dois isolados bacterianos *Enterobacter hormaechei* (código da placa nº 249.3), *Bacillus thuringiensis* (código da placa nº 251.4). Nesse sentido, foram inoculados em uma placa de Petri, um isolado de bactéria no centro com dois isolados fúngicos nas laterais, conforme a figura 1 e 2 abaixo.

Figura 1: A ordem de inibição dos isolados bacterianos com os isolados fúngicos.



Legenda: Isolado Bacteriano (IB) e Isolado fungico (IF)

A bactéria *Bacillus thuringiensis* 251.4; inibiu o crescimento de 110C3. Como a espécie *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva presente em vários ambientes como no solo, em material vegetal e água, tem como uma das suas características a propriedade microbicida, causando a morte de insetos por septicemia e agindo contra fitopatógenos causadores de murcha como o *Fusarium* spp. (SHARMA, [7].

A bactéria *Enterobacter hormaechei* 249.3 – interagiu com o crescimento dos 2 isolados. Esta interação contribui para a compreensão da ação de simbiose entre os isolados fúngicos com a bactéria estudada

CONCLUSÃO

O *Bacillus* spp, como a espécie *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva presente em vários ambientes como no solo, em material vegetal e água, com potencial de biocontrole já relatado na literatura para diversos fitopatógenos fúngicos. No estudo foi reportado a sua inibição a isolados fúngicos do cacau. Neste sentido, a bactéria *Bacillus Thuringiensis* possui grande potencial de controle biológico. Nesse sentido, o incentivo de estudos futuros que corroboram para um grande potencial biológico da bactéria a bactéria *Enterobacter* spp.

REFRÊNCIA

- [1] LIMA, O. D. D. R.; DOS SANTOS, M. S. B.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica in vitro de isolados de *Bacillus* spp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 57-64, 2014.
- [2] LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, Pelotas, v. 38, n. 3, p. 264-268, 2013.
- [3] ASSUMPÇÃO, L. D. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L. D.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Piracicaba, v. 44, p. 503-510, 2009.
- [4] POLONIO, J. C.; DE OLIVEIRA, A. A.; MOREIRA, J. R.; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; PAMPHILE, J. A. Avaliação da atividade antagonista in vitro de fungos endofíticos isolados de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteracea) com o fitopatógeno *Alternaria alternata*. **Arquivos do MUDI**, Maringá, v. 17, n. 2, p. 251-267, 2013.
- [5] HERRERA, S. D.; GROSSI, C.; ZAWOZNIK, M.; GROPPA, M. D. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, Buenos Aires, v. 186, p. 37-43, 2016.
- [6] BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol Mediterr.**, v. 41, p. 200-225, 2002.
- [7] SHARMA, Vikas; KAUR, Jashandeep; SHARMA, Shivika. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: potencial para uma agricultura sustentável. *Biotechnology Vegetal*. Villa Clara, v. 20, n. 3, pág. 157-166, set. 2020.