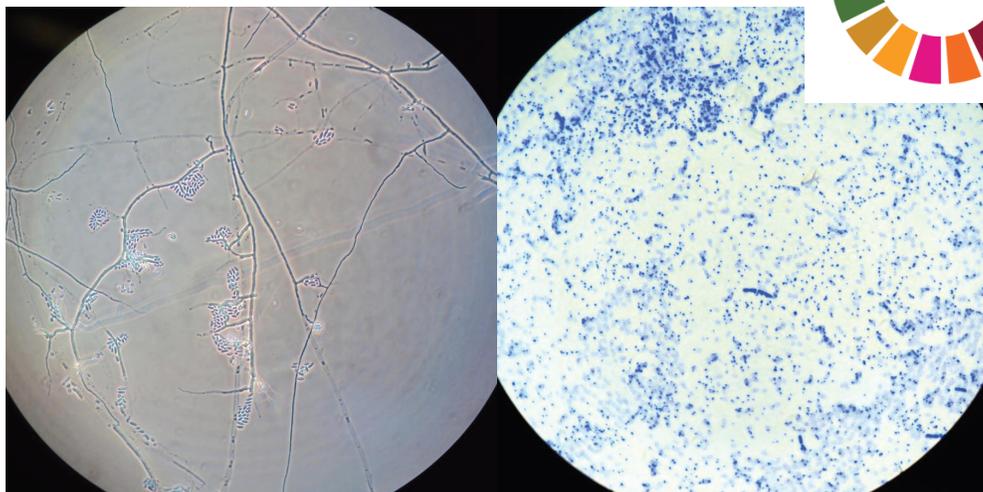


Potencial Multifuncional de Isolados de de *Bacillus thuringiensis* para Controle de Fungos Fitopatogênicos e Promoção de Crescimento Vegetal

**OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
198**

**Potencial Multifuncional de Isolados
de *Bacillus thuringiensis* para Controle
de Fungos Fitopatogênicos e
Promoção de Crescimento Vegetal**

Thábata Alvares Fernandes
Maycon Campos Oliveira
Fernanda de Cássia Batista
Vitória Palhares Ribeiro
Eliane Aparecida Gomes
Fernando Hercos Valicente
Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira
Simeone, Roberto dos Santos Trindade e
Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Foto da capa
Maycon Campos Oliveira

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Potencial multifuncional de isolados de *Bacillus thuringiensis* para controle
de fungos fitopatogênicos e promoção de crescimento vegetal / Thábata
Alvares Fernandes ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo,
2019.

31 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e
Sorgo, ISSN 1679- 0154; 198).

1. Controle biológico. 2. Bactéria. 3. Fungo. I. Fernandes, Thábata Alvares
. II. Oliveira, Maycon Campos. III. Batista, Fernanda de Cássia. IV. Ribeiro,
Vitória Palhares. V. Gomes, Eliane Aparecida. VI. Valicente, Fernando
Hercos. VII. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. VII. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

Sumário

| | |
|------------------------------|----|
| Resumo | 05 |
| Abstract | 07 |
| Introdução..... | 08 |
| Material e Métodos | 10 |
| Resultados e Discussão | 14 |
| Conclusões..... | 25 |
| Referências | 26 |

Potencial Multifuncional de Isolados de *Bacillus thuringiensis* para Controle de Fungos Fitopatogênicos e Promoção de Crescimento Vegetal

Thábata Alvares Fernandes¹

Maycon Campos Oliveira²

Fernanda de Cássia Batista³

Vitória Palhares Ribeiro⁴

Eliane Aparecida Gomes⁵

Fernando Hercos Valicente⁶

Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁷

Resumo – A bactéria *Bacillus thuringiensis* é utilizada na agricultura para controle biológico de pragas, mas ainda existem poucos estudos em relação à capacidade dessa bactéria no controle biológico de doenças e na promoção do crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de isolados de *B. thuringiensis*, pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, em solubilizar fontes insolúveis de fosfato, produzir ácido indolacético (AIA), fixar nitrogênio e controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos. Ao todo, 45 isolados de *B. thuringiensis* foram avaliados. Todos apresentaram halo de solubilização em meio sólido contendo fosfato de cálcio (P-Ca) e foram avaliados também em ensaios de solubilização

¹ Estudante de Engenharia Ambiental, Estagiária, Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM;

² MSc em Microbiologia Agrícola, DSc em Ciências Biológicas (Bioquímica), Analista, Embrapa Milho e Sorgo;

³ Eng. Ambiental, Estagiária, Embrapa Milho e Sorgo;

⁴ Bióloga, MSc em Bioengenharia, Estagiária, Embrapa Milho e Sorgo;

⁵ Bióloga, MSc em Microbiologia Agrícola, DSc em Genética e Melhoramento, Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo;

⁶ Eng. Agrôn., MSc em Entomologia, DSc em Entomologia/Genética Molecular, Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo;

⁷ Eng. Agrôn., MSc em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, DSc em Interação Planta-Microrganismos, Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo

em meio líquido, produção de auxinas, controle biológico de fungos fitopatogênicos e fixação de nitrogênio. Nenhum dos isolados testados apresentou capacidade de solubilização de P-Fe, tanto em meio sólido quanto em meio líquido. Vinte isolados de *B. thuringiensis* apresentaram valores estatisticamente similares de liberação de P solúvel em meio líquido P-Ca, variando de 28,79 mgP.L⁻¹ a 24,84 mgP.L⁻¹. Foram observadas correlações negativas entre a liberação de fósforo e o pH das culturas, o que pode indicar a produção de ácidos orgânicos como mecanismo de solubilização de P-Ca utilizado por *B. thuringiensis*. Vinte e nove isolados apresentaram capacidade de inibição contra *Fusarium verticillioides* com percentagem de inibição variando de 5,75% a 32%, e quarenta e três isolados apresentaram capacidade de inibição contra *Colletotrichum graminicola* com percentagem de inibição variando de 8,70% a 76,23%. No total, a percentagem de inibição variou de 5,75% a 76,23% para os dois fungos. Houve produção de ácido indolacético (AIA) por 43 isolados, com percentagem variando de 2,18 µg/mL a 7,96 µg/mL. Não ocorreu fixação de nitrogênio por *B. thuringiensis* avaliados. Os isolados avaliados apresentaram maior potencial para uso em biocontrole de *C. graminicola* e intermediária eficiência na promoção de crescimento. Futuramente, estes isolados podem ser testados em plantas para validação do potencial de controle biológico de doenças e promoção de crescimento, tornando-se candidatos à formulação de produtos biológicos do tipo multifuncionais.

Termos para indexação: bactérias promotoras de crescimento, microrganismos multifuncionais, fosfato de cálcio, controle biológico de doenças..

Multi-Functional Potential Of *Bacillus thuringiensis* Isolates For Phytopathogenic Fungus Control And Vegetable Growth Promotion

Abstract – The *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bacterium is commonly used in agriculture for pest control. Currently, there are few studies focusing on their plant growth promoting properties, as well as their potential for fungal phytopathogens biocontrol. Therefore, the study was aimed to screening the Embrapa Milho e Sorgo Microbial Culture Collection to identify *Bt* isolates having potential of phosphate solubilization, biological nitrogen fixation, indole-3-acetic acid (IAA) production and biological control of fungal phytopathogens. We found forty-five *B. thuringiensis* isolates able to produce phosphate solubilization halo on NBRIP agar plates containing calcium phosphate (P-Ca). After tests in liquid medium with P-Ca, twenty of them showed statistically similar P release rates ($P > 0.05$), with values ranging from 24.84 mgP.L⁻¹ to 28.79 mgP.L⁻¹. Negative correlations were observed between the P-release and the pH of the cultures, suggesting that these microorganisms are producing organic acids, which may be directly involved in the solubilization of P-Ca. Forty-three isolates were able to produce IAA in the presence of tryptophan, ranging from 2,18 µg/mL to 7,96 µg/mL. None of the isolates tested showed P-Fe solubilization capacity or biological nitrogen fixation ability. Although the *Bt* isolates showed a low-to-intermediate plant growth promoting potential they were more effective as biological control agents, displaying capacity to inhibit phytopathogenic fungi such as *Fusarium verticillioides* and *Colletotrichum graminicola*. We found twenty-nine *Bt* isolates with antifungal activity against *F. verticillioides* (6-32% inhibition), and forty-three *Bt* isolates with antifungal activity against *C. graminicola* (9-76% inhibition). Among the *Bt* isolates evaluated we were able to select some candidates for future studies: three isolates that showed high inhibition rates against all tested phytopathogens (30-66% inhibition); and six isolates with high P-Ca solubilization rates that were previously characterized with high insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (81-86% mortality). The selected isolates can be tested in plants to validate their potential as plant growth promoters and biocontrol agents, be-

coming candidates for development of new multifunctional biological products for crop production.

Index terms: plant growth promoter bacteria, multifunctional microorganisms, calcium phosphate, plant disease biocontrol.

Introdução

O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Apesar de estarem presente em todo ciclo vegetal, eles apresentam baixa disponibilidade no solo. Solos da região do Cerrado, por exemplo, possuem elevado grau de intemperismo por causa do processo de formação e da baixa fertilidade, além de apresentarem toxicidade de alguns elementos químicos e baixa disponibilidade de nutrientes. Ainda que o nitrogênio seja um elemento abundante na natureza, as plantas não possuem a capacidade de absorvê-lo diretamente da atmosfera, sendo necessária a utilização de fertilizantes químicos ou a fixação biológica de nitrogênio para atender à demanda das culturas agrícolas (Döbereiner, 1984; Dalla Santa et al., 2004). Já para o fósforo, como sua disponibilidade no solo é limitada, existe a necessidade de aplicação de fertilizantes fosfatados solúveis para propiciar o crescimento das plantas (Barroso; Nahas, 2005; Viruel et al., 2014). Em razão dessa necessidade de disponibilização de nutrientes para o aumento da produção agrícola, o Brasil se tornou o quarto maior consumidor de fertilizantes no mundo (Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2017).

A maior parte dos fertilizantes utilizados no Brasil é importada e sua fabricação resulta da exploração de recursos minerais não renováveis. A utilização destes faz com que seja criada uma grande barreira no estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

Atualmente, com o aumento da preocupação ambiental e a ascensão das práticas agrícolas sustentáveis, tem-se investido cada vez mais em pesquisas que visam diminuir a adubação química sintética. Esses sintéticos representam um alto custo para o produtor e para a economia do País, além de causarem prejuízos ao meio ambiente. Nesse cenário, surgem os inoculantes, que são insumos agrícolas de ação fertilizante contendo, em sua formulação, microrganismos que promovem o crescimento das plantas.

Os inoculantes apresentam baixo custo, alta capacidade de recuperação dos solos e são recursos renováveis.

A eficiência destes bioprodutos está relacionada à capacidade da cepa do microrganismo em causar algum efeito para a planta, como biossolubilização de fósforo, fixação de nitrogênio e produção de substâncias estimulantes (hormônios e agentes de biocontrole).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um bastonete gram-positivo, que apresenta célula vegetativa de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, pertencente à família *Bacillaceae*. É uma bactéria entomopatogênica de ocorrência cosmopolita, encontrada no solo, em insetos mortos, grãos armazenados e água. Ela se caracteriza pela produção de cristais proteicos produzidos durante o processo de esporulação. Estes cristais possuem capacidade inseticida e são formados pelas proteínas Cry, codificadas pelos genes *cry*. Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* produz outras proteínas, como Cyt e Vip, que também possuem capacidade inseticida. As proteínas Cyt ocorrem no processo de esporulação e as proteínas Vip, durante a fase vegetativa e de desenvolvimento do *Bt*.

Em razão de sua capacidade inseticida, *B. thuringiensis* tem sido utilizado há mais de cinco décadas na agricultura para o controle biológico de pragas. *B. thuringiensis* pode ser utilizado no controle biológico como constituinte de bioinseticidas, em que esporos e toxinas são pulverizados sobre a planta, ou através da expressão de suas toxinas em plantas transgênicas. Além do seu uso no controle biológico de pragas, estudos recentes vêm demonstrando que *B. thuringiensis* possui potencial para ser utilizado também na promoção do crescimento de plantas e no controle biológico de fungos fitopatogênicos (Vassilev et al., 2006; Raddadi et al., 2008; Passari et al., 2014; Wang et al., 2014; Kassogué et al., 2016).

Os fungos fitopatogênicos geralmente são controlados com uso de agroquímicos. No entanto, o uso excessivo desses formulados pode aumentar os riscos de contaminação do meio ambiente, dos alimentos e causar danos à saúde humana (Xu; Kim, 2014). Diante disso, como estratégia para reduzir os efeitos negativos do uso dos defensivos e aumentar a eficiência de controle, métodos alternativos, como o controle biológico de fitopatógenos, vêm sendo estudados. A utilização de microrganismos com potencial de controle contra patógenos tem sido cada vez mais reconhecida como uma alternativa

promissora por ser uma técnica viável, segura ao meio ambiente e de baixo custo quando comparada com métodos convencionais de tratamento (Charan et al., 2011).

Nesse sentido, apesar de a bactéria *B. thuringiensis* já ser exaustivamente estudada e utilizada na agricultura para controle biológico de pragas, ainda existem poucos estudos sobre a capacidade dessa bactéria em inibir fungos fitopatogênicos, solubilizar fosfato de diferentes fontes desse nutriente, fixar nitrogênio e produzir auxinas, como o ácido indolacético (AIA).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o acervo da coleção de microrganismos para encontrar cepas de *Bt* capazes de realizar múltiplas funções como controle biológico de pragas e doenças, solubilização de fosfato, promoção do crescimento de plantas e fixação de nitrogênio. A obtenção de cepas multifuncionais de *Bt* será de grande valia no processo de desenvolvimento de inoculantes para uso agrícola sustentável.

O estudo em questão trata-se de pesquisas iniciais, visando a identificação de isolados de microrganismos com potencial para serem utilizados no desenvolvimento de novos produtos biológicos multifuncionais para a produção agrícola. Estes produtos podem atuar como biofertilizantes, biofungicidas e biopesticidas. Os biofertilizantes atendem a ODS 2, pois o uso de microrganismos para a promoção de crescimento vegetal, além de melhorar a qualidade do solo, pode contribuir para reduzir a dependência de fertilizantes obtidos a partir de fontes naturais não renováveis. Os biofungicidas e biopesticidas atendem a ODS 12, pois a adoção do controle biológico de pragas e doenças pode contribuir para reduzir os impactos negativos sobre a saúde e o meio ambiente provocados pelo uso dos defensivos agrícolas convencionais.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Milho e Sorgo, município de Sete Lagoas, MG, no ano de 2018.

Para a realização deste trabalho, um total de 45 isolados de *B. thuringiensis* foram selecionados aleatoriamente a partir do acervo da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e

Sorgo (CMMF). Como testemunha foi utilizado um isolado de *Azospirillum* sp. Isolados de fungos fitopagênicos (*Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum graminicola*) foram confrontados com os isolados de *B. thuringiensis*. Os microrganismos selecionados foram reativados a uma temperatura de 28-30 °C. Para o cultivo de *Bt* foi utilizado o meio de cultura Ágar LB+SAIS, constituído de 1 g/L de glicose; 8 g/L de caldo nutritivo; 5 g/L de extrato de levedura; 0,3 g/L de sulfato de magnésio ($MgSO_4$); 10 g/L de triptona; 0,02 g/L de sulfato de ferro II ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$); 0,02 g/L de sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$); 0,02 g/L de sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$); 5 g/L de cloreto de sódio (NaCl) e 15 g/L de ágar. *Azospirillum* foi cultivado em meio BMA (Batata Malato Ágar), composto de infusão de batata (200g/L); 2,5 g/L de ácido málico; 2 g/L de hidróxido de potássio (KOH); 2,5g/L de açúcar cristal; 2 ml/L de solução de micronutrientes ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,04 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 g/L; H_3BO_3 1,4 g/L; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 g/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1,175 g/L); 1 ml/L de solução de vitaminas (Biotina 0,1 g/L; piridoxol-HCl 0,2 g/L); e 15 g/L de ágar (Döbereiner et al., 1996). Fungos filamentosos foram crescidos em BDA (Batata Dextrose Ágar).

Eficiência de *B. thuringiensis* na solubilização de fosfato em meio de cultura sólido

Os 45 isolados de *Bt* foram inoculados em placas com meio de cultura sólido contendo fontes insolúveis de fosfato, fosfato de ferro (P-Fe) ou fosfato tricálcio (P-Ca). O meio de cultura de solubilização utilizado foi o meio NBRIP (Nautiyal, 1999), com modificações na concentração de glicose para 40 g/L e conteúdo, como única fonte de P, 5g/L de fosfato de ferro (P-Fe) ou 5g/L de fosfato tricálcio (P-Ca). As placas foram incubadas a 28-30 °C por um período de 20 dias, para visualização do halo indicador de solubilização.

Eficiência de *B. thuringiensis* na solubilização de fosfato em meio de cultura líquido

Os isolados *B. thuringiensis* foram crescidos por 3 dias a 30 °C e sob agitação constante de 150 rpm em meio caldo nutriente constituído de 1,0 g/L de extrato de bife; 2,0 g/L de extrato de levedura; 5,0 g/L de peptona e 5,0 g/L de cloreto de sódio. Após esse período, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (Biospectro, SP22), onde a densidade ótica (DO) a 540 nm

de todas as culturas foi ajustada para 0,5. Como branco foi utilizado o meio de cultura sem inoculação. Uma alíquota de 100 µL de cada cultura bacteriana padronizada foi transferida para um tubo falcon de 50 mL contendo 20 ml de meio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), com modificações na concentração de glicose para 40 g/L e acrescido de fosfato de ferro 5g/L (P-Fe) ou fosfato tricálcio 5g/L (P-Ca). As inoculações foram realizadas em três repetições por isolado. Após um período de incubação de 9 dias, sob agitação constante de 150 rpm, em temperatura de 30 °C, determinou-se o pH do meio e os teores de P liberados na amostra.

Para a determinação do P solúvel, as amostras foram centrifugadas (8.000 xg por 5 minutos), o sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman nº 42, e o P solúvel do sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro a 880 nm, utilizando o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962). Para determinar a quantidade de fósforo solúvel presente nas amostras foi preparada uma curva padrão contendo de 1,2 a 14 mg/L de KH_2PO_4 . Os valores de P solubilizados em decorrência da ação bacteriana foram calculados subtraindo-se das amostras o P solúvel contido no controle, meio de cultura com P-Ca ou P-Fe sem inoculação com microrganismos.

Avaliação da produção de auxinas (AIA) por *B. thuringiensis*

Para a análise de quantificação da produção de auxinas como ácido indolacético (AIA), os isolados foram avaliados pela metodologia proposta por Sarwar e Kremer (1995). Os microrganismos foram crescidos durante 5 dias a 30 °C, sob agitação de 100 rpm e sem a presença de luz, em meio caldo nutriente, suplementado com triptofano. Após incubação, o meio de cultura foi centrifugado por 10 minutos, a 6.000 rpm e o sobrenadante obtido foi utilizado para a quantificação da produção de AIA. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços (Costar 3799, Corning). Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de Salkowski (Gordon; Weber, 1951) preparada a partir da mistura de 500 µL da solução aquosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na concentração de 0,136 g/mL e 24,5 mL de solução aquosa de ácido perclórico 35% (v/v), e mantida em temperatura ambiente e sem luminosidade. Após 20 minutos, a absorbância foi determinada a 530 nm

em leitor de placas FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Alemanha) utilizando o software Omega - Control (BMG LABTECH, Alemanha).

Como controle negativo foi utilizado meio de cultura sem inoculação. Todas as amostras foram testadas em triplicata. A curva padrão de AIA foi construída com as leituras de absorbância de soluções de AIA comercial em concentrações iguais a 100; 80; 40; 20; 10 e 0 µg/mL, e o potencial de produção de AIA foi expresso em termos de µg de AIA/mL.

Avaliação do antagonismo de *B. thuringiensis* em meio sólido

Para verificar a capacidade antifúngica dos isolados de *Bt* foi utilizado o teste de confrontação direta *in vitro*. Este teste é um método de triagem convencional apropriado para avaliar com maior rapidez e menor custo um grande número de microrganismos com atividade antagonista (Mota et al., 2017). Os isolados de *B. thuringiensis* foram utilizados na avaliação do antagonismo *in vitro* contra *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum graminicola*. Inicialmente, três discos de 5 mm da borda da cultura pura do patógeno, crescido por sete dias em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), foram transferidos para três pontos equidistantes em uma placa de Petri contendo o mesmo meio. Foram transferidos 5 µL de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL de *B. thuringiensis*, em quatro pontos equidistantes entre si e ao redor de cada disco de micélio. O teste foi realizado em triplicata, e o controle foi composto de placas contendo apenas o fitopatógeno. As placas foram incubadas por sete dias a 28-30 °C. A medição do raio da colônia do fitopatógeno foi realizada na presença e ausência do microrganismo antagonista. A percentagem de inibição foi calculada a partir da seguinte fórmula: % inibição = (1 - (crescimento do fungo/crescimento do controle)) x 100 (Montealegre et al., 2003; Passari et al., 2014).

Avaliação da capacidade de *B. thuringiensis* em fixar nitrogênio

Para verificar a capacidade dos *B. thuringiensis* em fixar nitrogênio foi feito o teste de formação de película em meio de cultura semissólido sem fonte de nitrogênio, meio LGI (Baldani, 1984). Uma colônia de cada isolado,

reativada em meio Ágar LB+SAIS, foi transferida para tubos tipo penicilina contendo 5 mL de meio de cultura LGI, composto de 5 g/L sacarose; 0,2 g/L K_2HPO_4 ; 0,6 g/L KH_2PO_4 ; 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 2H_2O$; 0,02 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,002 g/L $Na_2Mo_4 \cdot 2H_2O$; 5 ml/L de Azul de bromotimol (solução 0,5 % em 0,2 N KOH); 4 ml/L FeDTA (solução 1,64 %); 1 mL/L solução de vitaminas e 1,75 g/L de ágar. Os tubos foram incubados a 28-30 °C por um período de até 10 dias. Durante este período os tubos foram diariamente avaliados quanto à presença de película indicadora de fixação de nitrogênio. Como controle positivo foram utilizados tubos com meio LGI inoculados com *Azospirillum sp.*

Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra, sendo submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011) e, quando ocorreu diferença significativa pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa EXCEL a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Solubilização de fosfato

Todos os 45 isolados de *B. thuringiensis* avaliados apresentaram crescimento e formação de halo de solubilização em meio de cultura P-Ca sólido (Figura 1). Nenhum dos isolados testados apresentou formação de halo de solubilização em meio de cultura P-Fe sólido.

A presença de halo de solubilização em meio de cultura sólido sugere a eficiência dos microrganismos em solubilizar P de fontes insolúveis. Os meios de cultura utilizados neste trabalho contêm fontes insolúveis de P na forma de fosfato tricálcio (P-Ca) ou fosfato de ferro (P-Fe). Segundo Whitelaw e Sparks (2000), o potencial de solubilização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e a sua relação com o tamanho da colônia. Contudo, existem relatos na literatura de isolados que, apesar de não produzirem halo visível indicativo de

solubilização em meio sólido, são capazes de solubilizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos em meio de cultura líquido (Oliveira et al., 2009; Sousa, 2010). Sousa (2010) verificou que alguns isolados selecionados como não solubilizadores em meio de cultura sólido apresentaram eficiência de solubilização em meio líquido. Desta forma, o ensaio de solubilização de fosfato em meio sólido não deve ser considerado como único método para seleção de microrganismos eficientes para solubilização de fosfatos (Abreu, 2014).

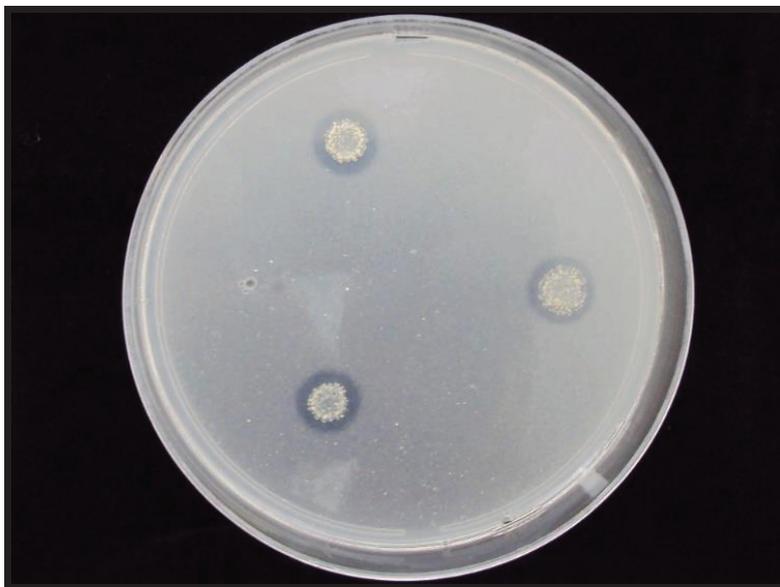


Figura 1. Halo de solubilização de fosfato por *Bacillus thuringiensis* em meio sólido contendo fosfato tricálcio (P-Ca). Em cada placa foram feitas inoculações em triplicata na forma de pontos. Após secagem, as placas foram incubadas a 28-30 °C por um período de 20 dias. O processo de solubilização de fosfato foi visualizado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias bacterianas.

Os 45 isolados de *B. thuringiensis* foram avaliados também em ensaios de solubilização de fosfato em meio líquido P-Ca e P-Fe. Ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) na solubilização de fósforo dos microrganismos testados em meio de cultura líquido contendo como única fonte de P o fosfato tricálcio (P-Ca) (Tabela 1). Já nos ensaios em meio de cultura líquido contendo como única fonte de P o fosfato de ferro (P-Fe) não houve eficiência de solubilização, ou seja, os microrganismos apresentaram resultados de solubilização igual ou abaixo do controle não inoculado (dados não mostrados). A baixa incidência de microrganismos solubilizadores de fosfatos de cálcio que adicionalmente solubilizam fosfatos de alumínio ou de ferro também foi relatada em outros estudos (Barroso; Nahas, 2005; Marra et al., 2012). Em alguns casos, os isolados microbianos foram capazes de solubilizar somente o fosfato de cálcio (Wenzel et al., 1994). Isso pode ser explicado pela diferença na solubilidade desses fosfatos em solução, pois o fosfato tricálcio, apesar de ser uma fonte de P potencialmente insolúvel, parece não ser tão difícil de ser dissolvido quando comparado com outros fosfatos (Bashan et al., 2013).

Dentre os 45 isolados *B. thuringiensis* avaliados, houve um total de 30 isolados que apresentaram valores estatisticamente similares de liberação de P solúvel, variando de 28,79 mgP.L⁻¹ a 24,84 mgP.L⁻¹ (Tabela 1). Houve redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de pH entre microrganismos após 9 dias de incubação (Tabela 1). Os valores de pH das culturas em meio líquido fosfato tricálcio (P-Ca) variaram de 6,72 (controle sem inoculação) até 4,34 (Tabela 1). Foi observada uma correlação negativa de -0,76 entre a liberação de fósforo e o pH das culturas de *B. thuringiensis*. A correlação negativa entre a liberação de fósforo e o pH do meio pode indicar a maneira pela qual o fosfato tricálcio é solubilizado por estas bactérias, uma vez que um dos mecanismos de solubilização de P desenvolvidos por microrganismos consiste na liberação de metabólitos (ácidos orgânicos) capazes de acidificarem o meio de cultivo (Whitelaw; Sparks, 2000; Rodriguez et al., 2004; Marra et al., 2011).

Estudos realizados por Kassogué et al. (2016) e Passari et al. (2014) relataram que *B. thuringiensis* tem potencial para ser utilizado na solubilização de fosfato tricálcio (P-Ca), demonstrando bons resultados em ensaios de formação de halo em meio de cultura sólido. Já Wang et al. (2014) observaram eficiência na solubilização de fosfato de alumínio por *B. thuringiensis* em ensaios de solubilização em meio líquido e em ensaios de promoção de crescimento de plantas de amendoim em casa de vegetação. A

solubilização de fosfato de alumínio por *B. thuringiensis* também ocorreu por meio da excreção de ácidos orgânicos e diminuição do pH do meio (Wang et al., 2014).

Em geral, os valores de solubilização de P encontrados neste trabalho foram menores que os relatados para outros microrganismos eficientes na solubilização de P. Por exemplo, Abreu et al. (2017) encontraram valores de solubilização de até 191 mgP.L⁻¹ em meio de cultura líquido P-Ca utilizando isolados do gênero *Bacillus*. Entretanto, a capacidade de solubilização de P por isolados de *Bt*, ainda que baixa, pode representar um acréscimo no acúmulo de fósforo nas plantas, o que futuramente poderá ser avaliado. As cepas de *B. thuringiensis* utilizadas neste estudo foram originalmente isoladas para serem usadas no controle biológico de pragas. Valicente e Barreto (2003) avaliaram a coleção de *B. thuringiensis* em bioensaios contra *Spodoptera frugiperda* e calcularam a taxa de mortalidade de lagartas provocada por cada isolado. Ao relacionar os dados de solubilização de fosfato tricálcio (P-Ca), obtidos neste trabalho, com os dados de mortalidade de *S. frugiperda*, observou-se que 6 dos melhores *B. thuringiensis* solubilizadores de fosfato, os isolados CBE1360, CBE1654, CBE1745, CBE1930, CBE1943 e CBE2060, com liberação de P solúvel variando de 24,98 a 28,79 mgP.L⁻¹, apresentaram também eficiência no controle biológico de pragas, com taxa de mortalidade de *S. frugiperda* acima de 80% (Tabela 1). Estes isolados constituem potenciais candidatos para serem utilizados no desenvolvimento de produtos agrícolas multifuncionais, ou seja, produtos com ação biopesticida e também biofertilizante.

Tabela 1. Valores de pH e liberação de fósforo solúvel, produção de ácido indolacético(AIA) e inibição contra *Fusarium verticillioides* e *Colletotrichum graminicola*, por isolados de *B. thuringiensis*.

| Isolado | Solubilização de P-Ca* | | Mortalidade (%)** | Produção de AIA (µg/mL)* | Taxa de Inibição (%)* | |
|----------|-------------------------|--------|-------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | P (mg.L ⁻¹) | pH | | | <i>Colletotrichum graminicola</i> | <i>Fusarium verticillioides</i> |
| Controle | 0,24 a | 6,72 c | -- | 0,00 a | 0,00 a | 0,00 a |
| CBE26 | 26,83 d | 4,78 b | 37,8 | 4,99 c | 46,53 c | 6,93 b |
| CBE28 | 23,98 c | 4,75 b | 12,8 | 6,50 d | 42,57 c | 7,80 b |
| CBE43 | 25,26 d | 4,78 b | 10,4 | 3,27 b | 49,50 c | 14,29 c |
| CBE135 | 28,03 d | 4,68 a | 13,0 | 3,22 b | 44,55 c | 9,09 b |
| CBE194 | 21,17 b | 4,80 b | 30,4 | 4,21 c | 45,54 c | 0,00 a |
| CBE291 | 22,43 c | 4,72 b | 20,8 | 3,32 b | 43,56 c | 14,29 c |
| CBE338 | 25,63 d | 4,70 b | 12,5 | 2,90 b | 52,47 c | 2,163 a |
| CBE508 | 19,25 b | 4,82 b | 0,0 | 5,09 c | 33,66 b | 0,00 a |
| CBE583 | 17,05 b | 4,85 b | 33,3 | 2,49 b | 43,56 c | 5,20 a |
| CBE902 | 20,60 b | 4,66 a | 21,7 | 2,18 b | 53,28 d | 4,67 a |
| CBE978 | 23,42 c | 4,49 a | 87,0 | 3,38 b | 0,00 a | 13,89 c |
| CBE998 | 22,63 c | 4,76 b | 60,0 | 3,48 b | 8,70 a | 16,67 c |
| CBE1048 | 26,66 d | 4,74 b | 16,7 | 1,13 a | 34,78 b | 9,26 b |
| CBE1117 | 25,53 d | 4,72 b | 50,0 | 4,88 c | 47,83 c | 10,19 b |
| CBE1225 | 25,10 d | 4,59 a | 20,0 | 6,39 d | 49,56 c | 12,96 c |
| CBE1245 | 26,95 d | 4,67 a | 13,0 | 4,31 c | 61,74 d | 11,11 b |
| CBE1249 | 27,27 d | 4,34 a | 25,0 | 3,58 b | 60,00 d | 7,41 b |
| CBE1282 | 26,56 d | 4,53 a | 8,7 | 3,06 b | 61,74 d | 11,11 b |
| CBE1329 | 27,61 d | 4,73 b | 17,4 | 4,15 c | 50,41 c | 8,33 b |
| CBE1360 | 28,79 d | 4,83 b | 81,8 | 4,20 c | 53,91 d | 14,82 c |
| CBE1372 | 26,78 d | 4,74 b | 58,3 | 7,96 d | 58,18 d | 4,60 a |
| CBE1405 | 25,40 d | 4,60 a | 12,5 | 4,30 c | 46,36 c | 4,60 a |
| CBE1432 | 26,85 d | 4,85 b | 63,1 | 4,52 c | 57,27 d | 0,00 a |
| CBE1462 | 24,84 d | 4,74 b | 79,0 | 3,84 b | 54,55 d | 5,75 b |
| CBE1516 | 23,77 c | 4,75 b | 34,7 | 7,69 d | 35,76 b | 25,29 d |
| CBE1654 | 25,67 d | 4,71 b | 86,3 | 5,30 c | 58,18 d | 17,24 c |
| CBE1703 | 28,14 d | 4,86 b | 52,0 | 5,71 d | 42,73 c | 5,75 b |
| CBE1744 | 22,46 c | 4,81 b | 59,0 | 5,87 d | 61,91 d | 2,30 a |
| CBE1745 | 28,42 d | 4,56 a | 85,0 | 4,57 c | 53,64 d | 17,24 c |
| CBE1749 | 25,70 d | 4,66 a | 22,7 | 3,63 b | 62,73 d | 2,30 a |
| CBE1858 | 25,89 d | 4,73 b | 18,2 | 6,81 d | 66,94 e | 31,00 d |
| CBE1870 | 25,60 d | 4,77 b | 36,3 | 4,93 c | 65,29 e | 32,00 d |
| CBE1930 | 25,81 d | 4,79 b | 90,0 | 6,03 d | 57,85 d | 21,00 c |
| CBE1939 | 23,64 c | 4,64 a | 19,0 | 6,83 d | 66,94 e | 27,00 d |
| CBE1943 | 24,98 d | 4,64 a | 83,3 | 0,00 a | 57,85 d | 7,00 b |
| CBE1974 | 25,35 d | 4,86 b | 76,2 | 3,58 b | 59,50 d | 11,00 b |
| CBE2054 | 23,82 c | 4,64 a | 85,7 | 5,77 d | 59,50 d | 2,33 a |
| CBE2058 | 19,50 b | 4,60 a | 33,3 | 2,59 b | 50,41 c | 10,00 b |
| CBE2060 | 26,67 d | 4,82 b | 80,9 | 5,14 c | 57,85 d | 8,00 b |
| CBE2466 | 25,99 d | 4,95 b | 54,5 | 4,62 c | 60,33 d | 1,67 a |
| CBE2629 | 20,45 b | 4,71 b | 4,2 | 5,04 c | 52,29 c | 7,00 b |
| CBE2635 | 25,98 d | 4,78 b | 8,3 | 3,94 b | 76,23 e | 3,67 a |
| CBE2636 | 28,68 d | 4,68 a | 0,0 | 4,98 c | 50,82 c | 0,00 a |
| CBE2640 | 25,84 d | 4,66 a | 0,0 | 5,56 c | 65,57 e | 5,00 a |
| CBE2646 | 27,16 d | 4,79 b | 12,5 | 4,62 c | 61,47 d | 4,67 a |

*Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro analisado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**Mortalidade obtida em bioensaios contra *Spodoptera frugiperda* (Valicente; Barreto, 2003)

Produção *in vitro* de AIA dependente de triptofano

Dos 45 isolados avaliados, quarenta e três apresentaram capacidade de produção de AIA dependente de triptofano. Dez isolados foram os maiores produtores de AIA, com valores estatisticamente similares variando de 5,91 a 7,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e apenas os isolados CBE 1048 e CBE 1943 não produziram quantidades significativas de AIA (Tabela 1).

Esta auxina está relacionada com a promoção de crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de nutrientes e água do solo e, conseqüentemente, melhorar o crescimento da planta (Lambrecht et al., 2000; Vacheron et al., 2013). Entretanto, o impacto do AIA bacteriano no desenvolvimento das plantas pode variar de efeitos positivos a negativos (Persello-Cartieaux et al., 2003). A faixa efetiva de concentração de AIA para promover crescimento vegetal vai depender da espécie de planta e da sensibilidade do tecido vegetal ao fitormônio (Etesami et al., 2015). Para algumas espécies de plantas, baixas concentrações de AIA mostraram aumentar a taxa de alongamento das raízes, enquanto concentrações mais altas provocaram inibição do crescimento (Persello-Cartieaux et al., 2003; Etesami et al., 2015). Em estudos com arroz, por exemplo, Etesami et al. (2014) demonstraram que isolados bacterianos com baixa capacidade de produção de AIA (0-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e alta capacidade de produção de ACC desaminase foram mais eficientes em colonizar raízes de arroz que isolados apresentando capacidade de produção de AIA de intermediária (10-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a alta (>20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), porém, com baixa capacidade de produção de ACC deaminase. A relação entre AIA e ACC deaminase na promoção de crescimento vegetal está relacionada com o etileno, outro importante fitormônio envolvido na resposta a estresses que pode provocar, entre outros efeitos, a inibição do alongamento de raízes (Glick et al., 2007). A produção de ACC desaminase por bactérias promotoras de crescimento provoca redução dos níveis de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), o precursor imediato da síntese do etileno. Por outro lado, altos níveis de AIA produzidos por bactérias na rizosfera podem estimular a atividade da enzima ACC sintase, elevando assim o nível de etileno (Persello-Cartieaux et al., 2003; Etesami et al., 2015).

Embora a capacidade de produção de ACC deaminase não tenha sido avaliada, os valores de produção de AIA obtidos neste estudo foram similares aos encontrados na literatura em trabalhos com *B. thuringiensis* (Raddadi

et al., 2008; Vidal-Quist et al., 2013). A relevância do AIA produzido por *B. thuringiensis* para a colonização de raízes e promoção de crescimento vegetal ainda precisa ser mais bem investigada. Considerando os aspectos multifuncionais, dos isolados de *Bt* utilizados neste estudo pode-se destacar como promissor, para estudos futuros, o isolado CBE1930, que apresentou capacidade de solubilização de P-Ca de 25,81 mgP.L⁻¹, produção de 6,03 µg mL⁻¹ de AIA e taxa de mortalidade de *S. frugiperda* de 90% (Tabela 1).

Fixação de nitrogênio

Não existem, até o momento, relatos na literatura de linhagens de *B. thuringiensis* capazes de fixar nitrogênio. Contudo, analisando 16 genomas de *B. thuringiensis*, disponibilizados no banco de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2018), foi possível identificar a presença de genes anotados como nitrogenases ou outras proteínas hipotéticas possivelmente envolvidas na fixação biológica de nitrogênio (Tabela 2). Para verificar se os isolados de *B. thuringiensis* utilizados neste trabalho possuem capacidade de fixação biológica de nitrogênio, foram realizados ensaios de formação de película em meio de cultura semissólido sem fonte de nitrogênio (Figura 2). Bactérias fixadoras de nitrogênio quando inoculadas em meio semissólido se deslocam para a região do meio de cultura onde a taxa de difusão de oxigênio está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias. Nessa faixa, formam-se películas em forma de véu, movendo-se em direção à superfície, quando as células atingem número suficientemente elevado, para escoar o oxigênio excessivo que se acumula em volta delas, ativando assim a nitrogenase (Döbereiner et al., 1996). Nenhum dos isolados de *B. thuringiensis* testados foi capaz de apresentar formação de película em meio LGI (Baldani, 1984). Os genes de fixação de nitrogênio presentes no genoma de *B. thuringiensis* podem ser resquícios do passado evolutivo e não codificaram proteínas ativas, entretanto, a capacidade de fixação biológica de nitrogênio já foi observada para outras espécies do gênero *Bacillus* (Xie et al., 1998; Ding et al., 2005).

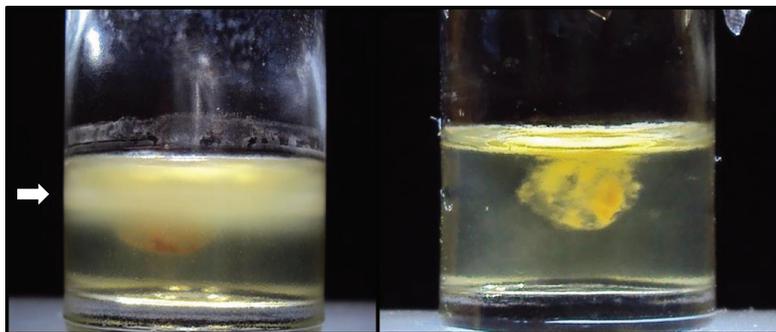


Figura 2. Teste de formação de película em meio de cultura semissólido sem fonte de nitrogênio. Frascos contendo meio LGI semissólido foram inoculados com *Azospirillum sp.* (frasco da esquerda) ou *Bacillus thuringiensis* (frasco da direita). A presença de película indicadora da fixação de nitrogênio foi observada apenas no frasco inoculado com *Azospirillum sp* (seta branca).

Tabela 2. Análise da presença de genes envolvidos com fixação biológica de nitrogênio no genoma de *Bacillus thuringiensis* de acordo com o banco de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2018).

| Código | Organismo Linhagem | Ano de publicação do Genoma | Qde. de genes Nfix | Genes envolvidos com a fixação biológica de N | |
|-------------|--|-----------------------------|--------------------|---|--|
| | | | | Nome do gene | Anotação |
| btk | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar konkukian 97-27 | 2004 | 1 | BT9727_4689 | Nitrogen fixation protein NifU |
| btl | <i>Bacillus thuringiensis</i> AI Hakam | 2006 | 3 | BALH_1233 BALH_3182 BALH_4512 | Nitrogenase (flavodoxin) Flavodoxin (nitrogenase) Nitrogen fixation protein NifU |
| btb | <i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171 | 2010 | 1 | BMB171_C4589 | Nitrogen fixation protein NifU |
| btt | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki HD73 | 2013 | 1 | HD73_5349 | Nitrogen fixation protein NifU |
| bthr | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki YBT-1520 | 2014 | 2 | YBT1520_26345 YBT1520_26490 | Putative nitrogen fixation protein YutI Nitrogen fixation protein NifU |
| bthi | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kurstaki HD-1 | 2014 | 2 | BTK_26275 BTK_26420 | Putative nitrogen fixation protein YutI Nitrogen fixation protein NifU |
| btc | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar chinensis CT-43 | 2012 | 1 | CT43_CH5038 | Nitrogen fixation protein NifU |
| btf | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar finitimus YBT-020 | 2012 | 2 | YBT020_24575 | nitrogen-fixing NifU domain-containing protein |
| btm | <i>Bacillus thuringiensis</i> MC28 | 2012 | 2 | YBT020_24715 MC28_0612 | Nitrogen fixation protein NifU Nitrogenase |
| btg | <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 | 2012 | 2 | MC28_4244 BTB_c51730 | Nitrogen fixation protein NifU Putative nitrogen fixation protein YutI |
| bti | <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771 | 2012 | 1 | BTB_c52030 | Nitrogen fixation protein NifU |
| btin | <i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 | 2013 | 1 | BTG_23690 | Nitrogen fixation protein NifU |
| btht | <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar thuringiensis IS5056 | 2013 | 1 | BTF1_23445 H175_ch5120 | Nitrogen fixation protein NifU Nitrogen fixation protein NifU |
| bthu | <i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518 | 2013 | 1 | YBT1518_27675 | Nitrogen fixation protein NifU |
| btw | <i>Bacillus thuringiensis</i> HD1011 | 2015 | 1 | BF38_733 | Nitrogen fixation protein NifU |
| bthy | <i>Bacillus thuringiensis</i> YWC2-8 | 2017 | 2 | AQ980_04565 AQ980_04720 | Nitrogen fixation protein NifU Nitrogen fixation protein NifU |

Antagonismo contra fungos fitopatogênicos

Todos os 45 isolados de *Bt* foram testados quanto ao seu potencial de inibição contra os fungos fitopatogênicos *F. verticillioides* e *C. graminicola* (Tabela 1, Figuras 3 e 4). Com exceção dos isolados CBE978 e CBE998, todos os isolados de *Bt* apresentaram inibição significativa do crescimento de *C. graminicola*. Já em relação a *F. verticillioides*, 16 isolados de *Bt* não apresentaram capacidade antagonista significativa contra este fungo. Provavelmente esses isolados não são capazes de produzirem substâncias antagonistas ou produzem quantidades insuficientes para inibir o crescimento de *F. verticillioides*. Os isolados CBE1516, CBE1858, CBE1870 e CBE1939 apresentaram os maiores resultados de inibição contra *F. verticillioides*, com percentagem de inibição variando de 25,29% a 32,00%. Já os isolados CBE1858, CBE1870, CBE1939, CBE2635 e CBE2640 apresentaram as maiores taxas de inibição contra *C. graminicola*, com percentagem de inibição variando de 65,29% a 76,23%. Dentre estes, destacam-se os isolados CBE1858, CBE1870 e CBE1939, que apresentaram maior capacidade de inibição contra os dois fitopatógenos avaliados. De forma geral, quando comparados os resultados obtidos com os dois fungos, os isolados de *Bt* apresentaram alta capacidade antagonista contra *C. graminicola* e capacidade antagonista intermediária contra *F. verticillioides*. O mecanismo de inibição do crescimento de fungos filamentosos por *Bt* parece ser independente da produção de cristais com atividade inseticida, pois os isolados de *Bt* que apresentaram maior atividade antagonista não apresentaram alta mortalidade contra *S. frugiperda* (Tabela 1). Este efeito inibitório pode estar relacionado com a produção por *Bt* de quitinases ou de outras enzimas que podem ter ação contra a parede celular fúngica (Gomaa, 2012).

O potencial de *B. thuringiensis* para atuar como antagonista de fungos fitopatogênicos também foi avaliado por outros autores. Passari et al. (2014) isolaram 16 isolados de *Bt* a partir de solo rizosférico e verificaram que nove destes isolados apresentaram atividade inibitória significativa contra os fungos *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum*, com percentagem de inibição variando de 47% a 76%. Batista Júnior et al. (2002) avaliaram o antagonismo de dois isolados de *B. thuringiensis* contra os fungos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* sp. Ao longo de 26 dias de incubação,

os isolados de *Bt* testados apresentaram níveis variáveis de inibição contra os fitopatógenos. O crescimento de *Colletotrichum* sp. foi inibido durante todo o período de incubação, enquanto a inibição de *F. oxysporum* ocorreu apenas até o sétimo dia de incubação. Interessantemente, o isolado de *Bt* produtor de cristais proteicos com atividade inseticida apresentou maior capacidade antagonista que o isolado mutante não produtor de cristais proteicos. O isolado de *Bt* produtor de cristais foi capaz de inibir o crescimento de *Colletotrichum* sp. e dos isolados de *F. solani* durante todo o período de incubação. Remuska e Pria (2007) também avaliaram *in vitro* o antagonismo de *B. thuringiensis* contra fungos fitopatogênicos e compararam com *Trichoderma* sp. Os autores observaram que estes dois agentes antagonistas foram eficientes na inibição de *Sclerotium rolfsii*, porém *B. thuringiensis* mostrou-se mais eficiente que *Trichoderma* sp. no controle biológico dos fitopatógenos *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *F. solani*. A bactéria *B. thuringiensis*, além de inibir o crescimento da colônia de *S. sclerotiorum* em 37,44 %, não permitiu que o fungo formasse escleródios, que são estruturas de resistência que garantem a sobrevivência dele no solo por até oito anos (Remuska; Pria, 2007).

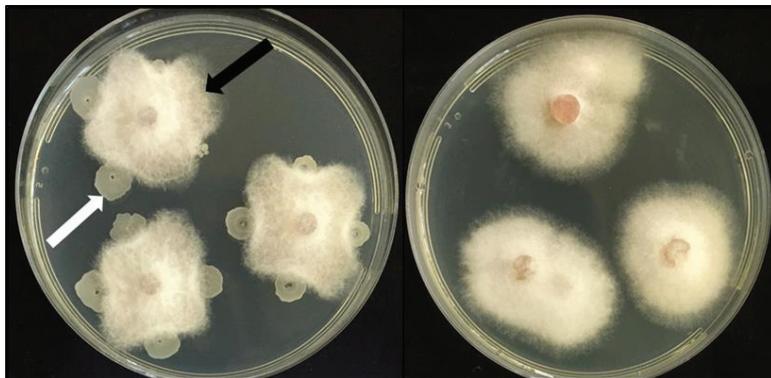


Figura 3. Teste de confronto direto do antagonista *Bacillus thuringiensis* em relação ao *Fusarium verticillioides*, em meio sólido BDA. Em cada placa foram feitas inoculações em triplicata na forma de pontos. O diâmetro da colônia do fungo (seta preta) crescido na presença de *B. thuringiensis* (seta branca) (placa esquerda) foi comparado com o diâmetro da colônia do fungo crescido na ausência de *B. thuringiensis* (placa direita).



Figura 4. Teste de confronto direto, em meio sólido BDA, para verificar a atividade antagonista de *Bacillus thuringiensis* contra *Colletotrichum graminicola*. Em cada placa foram feitas inoculações em triplicata do fungo fitopatogênico. O diâmetro da colônia do fungo (seta branca) crescido na presença de *B. thuringiensis* (seta preta) (placa esquerda) foi comparado com o diâmetro da colônia do fungo crescido na ausência de *B. thuringiensis* (placa direita).

Os fungos *C. graminicola* e *F. verticillioides* são agentes etiológicos de doenças na cultura de milho. A antracnose, causada pelo fungo *C. graminicola*, ocasiona nas plantas infectadas quebra de colmo, seguida de acamamento, até a morte prematura da planta (Ferreira; Casela, 2001). O fungo *F. verticillioides* é um patógeno amplamente distribuído nas principais regiões produtoras de milho do Brasil e do mundo, causando severas podridões em raízes, colmos e grãos (Fernandes; Oliveira, 1997). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que isolados de *Bt* podem ser utilizados no controle biológico desses importantes fitopatógenos.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo indicam que, além do seu uso para controle biológico de pragas, os isolados de *B. thuringiensis*, pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, apresentaram potencial intermediário para a promoção de crescimento e plantas e alto potencial para o controle biológico de fungos fitopatogênicos.

Entre os isolados de *Bt* avaliados, foi possível selecionar alguns isolados promissores para serem utilizados em estudos futuros: três isolados (CBE1858, CBE1870 e CBE1939) que apresentaram altas taxas de inibição contra todos os fitopatógenos testados (30-66% de inibição); e seis isolados (CBE1360,

CBE1654, CBE1745, CBE1930, CBE1943 e CBE2060) com capacidade de solubilização de P-Ca que foram previamente caracterizadas com alta atividade inseticida contra *Spodoptera frugiperda* (81-86% de mortalidade). Os isolados selecionados precisam ser testados em plantas para validar seu potencial como promotores de crescimento vegetal e agentes de biocontrole, tornando-se candidatos ao desenvolvimento de novos produtos biológicos multifuncionais para a produção agrícola.

Referências

ABREU, C. S. de. **Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas, 2014.

ABREU, C. S. de; FIGUEIREDO, J. E. F.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. de A.; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/>>. Acesso em: 9 de set. 2017.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. 1984. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1984.

BARROSO, C.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, n. 1, p. 73-83, 2005.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A.; DE-BASHAN, L. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 4, p. 465-479, 2013.

BATISTA JÚNIOR, C. B.; ALBINO, U. B.; MARTINES, A. M.; SARIDAKIS, D. P.; MATSUMOTO, L. S.; AVANZI, M. A.; ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos

fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, 2002.

CHARAN, A. R.; REDDY, V. P.; REDDY, P. N.; REDDY, S. S.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based methods. **Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability**, v. 5, n. 1, p. 10-16, 2011.

DALLA SANTA, O.; HERNANDEZ, R.; ALVAREZ, G.; RONZELLI, P.; SOCCOL, C. Azospirillum sp inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 843-850, 2004.

DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; CHEN, S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **J Appl Microbiol**, v. 99, n. 5, p. 1271-1281, 2005.

DÖÖBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 83-90, 1984.

DÖÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 1996. 60 p.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; MIRSEYED HOSSEINI, H. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 183-258.

ETESAMI, H.; HOSSEINI, H.; ALIKHANI, H.; MOHAMMADI, L. Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and indole-3-acetic acid (IAA) as endophytic preferential selection traits by rice plant seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 3, p. 654-670, 2014.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 80 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 26).

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. **Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 13).

GLICK, B.; CHENG, Z.; CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 329-339, 2007.

GOMAA, E. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 103-111, 2012.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

KASSOGUÉ, A.; DICKO, A. H.; TRAORÉ, D.; FANÉ, O.; VALICENTE, F. H.; BABANA, A. H. *Bacillus thuringiensis* strains isolated from agricultural soils in Mali tested for their potentiality on plant growth promoting traits. **British Microbiology Research Journal**, v. 14, n. 3, p. 1-7, 2016.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMAS - KEGG. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em: 4 maio 2018.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

MARRA, L.; OLIVEIRA, S. de; SOARES, C.; MOREIRA, F. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MARRA, L.; SOARES, C.; OLIVEIRA, S. de; FERREIRA, P.; SOARES, B.; CARVALHO, R.; LIMA, J. de; MOREIRA, F. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1/2, p. 289-307, 2012.

MONTEALEGRE, J.; REYES, R.; PEREZ, L.; HERRERA, R.; SILVA, P.; BESOAIN, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological

control of *Rhizoctonia solani* in tomato. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 115-127, 2003.

MOTA, M. S.; GOMES, C. B.; SOUSA JÚNIOR, I. T.; MOURA, A. B. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 62-70, 2017.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Fems Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782-1787, 2009.

PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; ZOTHANSANGA, R.; KUMAR, N. S.; SINGH, B. P. Biocontrol activity of Phosphate-solubilizing *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains isolated from rhizosphere soil. **Science & Technology Journal of Mizoram University**, v. 2, n. 2, p. 6-12, 2014.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, v. 26, n. 2, p. 189-199, 2003.

RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 47-52, 2008.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting

bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.

SOUSA, C. A. de. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas**. 2010. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M.; TOURAINÉ, B.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; LEGENDRE, L.; WISNIEWSKI-DYE, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 356, 2013.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 639-644, 2003.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 2, p. 137-144, 2006.

VIRUEL, E.; ERAZZU, L.; CALSINA, L.; FERRERO, M.; LUCCA, M.; SINERIZ, F. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 819-831, 2014.

VIDAL-QUIST, J.; ROGERS, H.; MAHENTHIRALINGAM, E.; BERRY, C. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. **Fems Microbiology Ecology**, v. 86, n. 3, p. 474-489, 2013.

XIE, G.; SU, B.; CUI, Z. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River Valley. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 38, n. 6, p. 480-483, 1998.

XU, S. J.; KIM, B. S. Biocontrol of fusarium crown and root rot and promotion of growth of tomato by *paenibacillus* strains isolated from soil. **Mycobiology**, v. 42, n. 2, p. 158-166, 2014.

WANG, T.; LIU, M.; LI, H. Inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Bacillus thuringiensis* B1 increases available phosphorus and growth of peanut in acidic soil. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, v. 64, n. 3, p. 252-259, 2014.

WENZEL, C.; ASHFORD, A.; SUMMERELL, B. Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah. [*Telopea speciosissima* (Sm.) R. Br.]. **New Phytologist**, v. 128, n. 3, p. 487-496, 1994.

WHITELAW, M.; SPARKS, D. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, New York, v. 69, p. 99-151, 2000.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
CONSTRUINDO O FUTURO