



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS II
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA**

SAYONARA MEDEIROS DUARTE

ISOLAMENTO BACTERIANO DE SOLO DA HORTA MANDALA E ANTIBIOSE A
Rhizoctonia solani

**LAGOA SECA-PB
JUNHO/2024**

SAYONARA MEDEIROS DUARTE

ISOLAMENTO BACTERIANO DE SOLO DA HORTA MANDALA E ANTIBIOSE A

Rhizoctonia solani

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo)
apresentado a/ao coordenação / Departamento
do curso de Agronomia da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Élide Barbosa Corrêa

**LAGOA SECA-PB
JUNHO/2024**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

D812i Duarte, Sayonara Medeiros.

Isolamento bacteriano de solo da horta mandala e antibiose: a *Rhizoctonia solani*. [manuscrito] / Sayonara Medeiros Duarte. - 2024.

28 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, 2024.

"Orientação : Profa. Dra. Élide Barbosa Corrêa, Coordenação do Curso de Agroecologia - CCAA. "

1. Agricultura orgânica. 2. Controle biológico. 3. Promoção de crescimento. I. Título

21. ed. CDD 632

SAYONARA MEDEIROS DUARTE

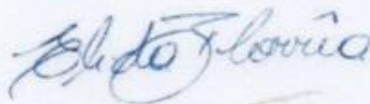
ISOLAMENTO BACTERIANO DE SOLO DA HORTA MANDALA E ANTIBIOSE

A Rhizoctonia solani

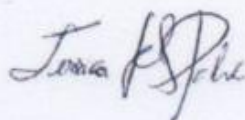
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a coordenação do curso de
Agronomia da Universidade Estadual da
Paraíba, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Aprovado em: 21/06/2024.

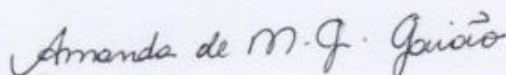
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Élide Barbosa Corrêa
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof^ª. Dr^ª Jéssica Karina Silva Pachu
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dr^ª Amanda de Melo Gonçalves Gaião
Universidade de Brasília (UnB)

AGRADECIMENTO

A Deus por me proteger e me guiar em todos os desafios da minha vida

À professora Dr^a. Élide Barbosa Corrêa por acreditar no meu desempenho, estar sempre à disposição e pelas orientações nas atividades desenvolvidas no laboratório.

Ao professor Dr. Adailson Feitoza de Jesus Santos e a pesquisadora Edilania Pereira da Silva por terem me recepcionado e pelas orientações e esclarecimentos nas diversas atividades realizadas na UNEB.

Aos meus familiares, por me incentivarem nos estudos e me acompanharem em cada degrau da minha vida e ao meu filho, razão de toda dedicação dos meus estudos.

Ao meu pai Sandro Marcson (*in memória*) e aos meus avós paternos, Zuleide de Araújo e Inácio Araújo (*in memória*), que em vida me proporcionaram uma educação de qualidade.

Aos colegas do grupo de pesquisa Agrobiodiversidade do Semiárido pelos momentos de amizade, estudo e apoio.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Placa com meio de cultivo Guimarães e papel filtro qualitativo.....	17
Figura 2: Placa de petri com Unidades Formadoras de Colônias (UFC) oriundas do solo horta mandala.....	19
Figura 3: Técnicas de semeadura. (A) esgotamento e (B) estria simples.....	19
Figura 4: Imagem da testemunha, fungo <i>Rhizoctonia solani</i> (A) Cultura em placa de Petri e (B) Hifas do fungo.....	21
Figura 5: Crescimento de <i>Rhizoctonia solani</i> pareado com a bactéria CFB 030 (C) e hifa do fungo e células bacterianas próximas a hifa (D).....	23
Figura 6: Quatro bactérias (CFB 004, CFB 007, CFB 001 e CFB 065) com produção de polímeros.....	24
Figura 7: Confirmação da produção de polímero nos tubos contendo etanol 100%. (A) Bactéria produtoras de polímero e (B) bactéria não produtoras de polímero.....	24
Figura 8: Placa com meio de cultivo para solubilizar fósforo.....	23
Figura 9: Tubos com meio de cultivo para fixa Nitrogênio. Tratamento CFB 012 (A) e testemunha (B).....	27

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Isolados bacterianos utilizados para a produção de exopolissacarídeos.....	17
Tabela 2 - Isolados bacterianos utilizados no pareamento com <i>Rhizoctonia solani</i>	20
Tabela 3 - Crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> após três dias de pareamento com isolados bacterianos.	21
Tabela 4 - Produção de polímeros, solubilização de Fósforo e Potássio e fixação de Nitrogênio em bactérias isoladas da horta mandala.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UNEB	Universidade Estadual da Bahia
PB	Paraíba
BA	Bahia
NA	Ágar Nutriente
D.B.O.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
S	Segundos
EPS	Extracellular Polymeric Substance
TSB	Trypticase Soy Broth
CFB	Coleção Fitopatológica de Bactérias
P	Fósforo
K	Potássio
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
DNA	Ácido desoxirribonucléico

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Grau Celsius
%	Porcentagem
$\leq$	Menor que ou igual a
-	Menos
+	Mais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Controle biológico de doenças.....	11
2.2 Bactérias agentes de biocontrole de doenças de plantas	12
2.3 O fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i>	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 Localização	14
3.2 Isolamento bacteriano.....	14
3.3 Teste de Gram	15
3.4 Antibiose das bactérias a <i>Rhizoctonia solani in vitro.</i>	15
3.5 Solubilização de fósforo e potássio	16
3.6 Fixação de Nitrogênio.....	16
3.7 Estatística	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
4.1 Isolamento bacteriano.....	17
4.2 Antibiose das bactérias a <i>Rhizoctonia solani in vitro.</i>	18
4.3 Solubilização de fósforo e potássio	21
4.4 Fixação de Nitrogênio.....	22
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25

ISOLAMENTO BACTERIANO DE SOLO DA HORTA MANDALA E ANTIBIOSE A

Rhizoctonia solani

Sayonara Medeiros Duarte

RESUMO

O controle biológico utiliza organismos vivos para reduzir populações patogênicas de forma sustentável e ambientalmente segura. O objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar bactérias habitantes do solo da horta mandala quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas e antagonismo ao fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Para tanto, foi realizado o isolamento bacteriano para o gênero *Bacillus*, seleção de bactérias Gram-positivas, capacidade de solubilização de fósforo e potássio, fixação de nitrogênio e antibiose a *R. solani* *in vitro*. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Sisvar. Foram isoladas 19 bactérias e testadas para o controle biológico a *R. solani* e dentre essas sete (CFB 001, CFB 004, CFB 007, CFB 008, CFB 020, CFB 030 e CFB 065) foram avaliadas quanto aos mecanismos de promoção de crescimento. O isolado CFB 004 solubilizou fósforo. A solubilização de potássio não foi observada dentre as bactérias. Os isolados CFB 001, CFB 004, CFB 008, CFB 020, CFB 030 e CFB 065 fixaram nitrogênio atmosférico. No teste de antibiose, o isolado CFB 030 produziu substâncias tóxicas ao fitopatógeno. Foi possível isolar e caracterizar 19 isolados bacterianos, quanto a antibiose a *R. solani*, solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio.

Palavras-Chave: Agricultura orgânica; Controle biológico; Promoção de crescimento.

ABSTRACT

Biological control uses living organisms to reduce pathogenic populations in a sustainable and environmentally safe way. The objective of the work was to isolate and characterize bacteria from mandala vegetable garden soil regarding the mechanisms for promoting plant growth and antagonizing the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. To this end, bacterial isolation was carried out for the genus *Bacillus* and selection of Gram-positive bacteria. Capacity of phosphorus and potassium solubilization, nitrogen fixation and antibiosis to *R. solani* *in vitro* were evaluated. Statistical analysis was performed using the Sisvar program. Nineteen bacteria were isolated and tested for biological control of *R. solani* and among these seven (CFB 001, CFB 004, CFB 007, CFB 008, CFB 020, CFB 030, and CFB 065) were evaluated for growth promotion mechanisms. Isolate CFB 004 solubilized phosphorus. Potassium solubilization was not observed among bacteria. Isolates CFB 001, CFB 004, CFB 008, CFB 020, CFB 030, and CFB 065 fixed atmospheric nitrogen. In the antibiosis test, isolate CFB 030 produced substances toxic to the phytopathogen. It was possible to isolate and characterize 19 bacterial isolates, regarding antibiosis to *R. solani*, phosphorus solubilization and nitrogen fixation.

Keywords: Organic farming; Biological control; Growth promotion.

1 INTRODUÇÃO

A sociedade vem cada vez mais, exigindo alimentos de boa qualidade, livres de insumos químicos e principalmente com uma garantia de orgânico. Segundo o IBGE (2024) no ano de 2021 foram produzidos 40.478 toneladas de alimentos orgânicos em todo o Brasil. Atualmente o Paraná é o estado com maior taxa de produtores certificados (3.805), em seguida estão o Rio Grande do Sul (3.586) e o Pará (2.633) (IBGE, 2024).

A produção dos alimentos orgânicos ocorre sem que haja contato do alimento e do agricultor com produtos ou adubos químicos (SOUZA; SOUZA, 2021). Pode-se notar que os produtos orgânicos valorizam um ambiente saudável em todos os aspectos. Segundo Souza e Souza (2021) o solo fica mais preservado sob o aspecto biológico, pois o agricultor acaba fazendo um manejo mais racional e natural do solo, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas.

Mesmo com todo cuidado quanto a preservação da biodiversidade, surgem alguns problemas com doenças de plantas. As doenças fúngicas são de extrema importância para a produção agrícola (HUSSAIN; KHAN, 2020). Uma delas é a rhizoctoniose causada por *Rhizoctonia solani*.

Rhizoctonia solani é um fungo Basidiomycota, disseminado pelo solo e pelas sementes, e capaz de sobreviver como saprófita no solo (AYDIN, 2022). A disseminação ocorre através da chuva e do escoamento da água da irrigação e também pelo vento (SENAPATI et al., 2022). Os sintomas das doenças provocadas pelo fitopatógeno são podridão de sementes e raízes, causando lesões profundas de coloração marrom-avermelhadas nos hipocótilos de mudas (RAHMAN et al., 2020).

Uma forma de buscar o equilíbrio populacional que ocorre naturalmente no ecossistema é promover o controle biológico (FONTES et al., 2020) que é um serviço ecossistêmico resultante da ação dos inimigos naturais. O controle biológico é utilizado como estratégia para reduzir a incidência ou severidade da doença através da aplicação de microrganismos benéficos, com efeito direto ou indireto sobre os agentes patogênicos das plantas (ABDELJALIL et al., 2021).

Os microrganismos benéficos colonizam os sistemas vegetais e desempenham um papel significativo nas culturas. Segundo Kour et al. (2020) esses microrganismos promovem o crescimento das plantas, melhorando o desenvolvimento por meio de vários mecanismos diretos e indiretos, como a fixação biológica de nitrogênio, a produção de vários hormônios

de crescimento vegetal, a solubilização de potássio e fósforo, entre outros. Dentre os microrganismos agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas se destacam as bactérias do gênero *Bacillus* spp. (LOPES et al., 2021).

O objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar bactérias habitantes do solo da horta mandala quanto aos mecanismos de promoção de crescimento (fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo e potássio) e antibiose a *R. solani*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle biológico de doenças

Controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos. Nesta definição, as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outros processos que determinam a infecção e desenvolvimento dos sintomas e reprodução (MICHEREFF, 2008)

Os métodos de biocontrole são eficazes e seguros e podem reduzir a presença de vários patógenos fúngicos ou suprimir suas propriedades patogênicas (ARASU; AL-DHABI, 2023). Esse tipo de controle tem sido sugerido como uma estratégia muito promissora para o manejo de fungos necrotróficos (SENAPATI et al., 2022), como *R. solani*. O antagonismo microbiano é uma propriedade comum encontrada entre microrganismos e é mais predominante entre os microrganismos que habitam o solo. Este efeito de antagonismo entre o patógeno e os microrganismos benéficos no solo levará a uma redução maior no desenvolvimento de doenças (SENAPATI et al., 2022).

A interação endofítico planta pode ser classificada como mutualística, já que os microrganismos recebem nutrientes e causam a proteção da planta; e em contrapartida produzem compostos químicos que em condições de estresse do hospedeiro, podem protegê-lo (PAZ, 2009).

Os microrganismos endofíticos compartilham algumas características gerais, como a colonização interna do hospedeiro, a simbiose, o antagonismo ao patógeno e a interação mutualística facultativa, dependendo da relação custo-benefício (PAZ, 2009). Além disso, eles podem atuar por meio de mecanismos como antibiose direta, promoção do crescimento vegetal e indução de resistência sistêmica nas plantas hospedeiras. Estudos demonstraram que

essas bactérias benéficas são altamente eficazes contra fitopatógenos bacterianos e fúngicos, nematoides e diversos insetos (DIMKIC et al., 2022).

O estudo de microrganismos do solo associados às plantas tem grande potencial, pois esses organismos estão direta ou indiretamente envolvidos na promoção do crescimento e no aumento da produtividade das plantas (DIAZ, 2022). Eles atuam diretamente por meio da dissolução de minerais, fixação de nitrogênio e produção de hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas e citocininas. Indiretamente, contribuem para o crescimento das plantas pela produção de substâncias como antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, compostos orgânicos voláteis, cianeto de hidrogênio, além de competirem com patógenos (DANESH et al., 2024).

Os microrganismos interagem de diversas maneiras com as plantas, beneficiando-as e garantindo recursos para si em troca. Várias espécies de fungos e bactérias são relatadas como promotoras de crescimento em diversas culturas e vêm sendo utilizadas como inoculantes biológicos na agricultura, com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas (DIAZ, 2022). As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) são o grupo mais utilizado contra uma ampla gama de patógenos de plantas (SENAPATI et al., 2022). Os principais gêneros de bactérias estudadas como antagonistas a fitopatógenos incluem *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Pasteuria* e *Enterobacter* (FREIRE et al., 2019).

2.2 Bactérias agentes de biocontrole de doenças de plantas

As bactérias colonizam as plantas de forma epifítica e endofítica. Bactérias epifíticas colonizam a superfície das plantas e as endofíticas o interior. As bactérias podem promover o crescimento das plantas e atuarem por mecanismos diretos de controle biológico (ARASU; AL-DHABI, 2023). Bactérias endofíticas associadas às raízes das plantas são altamente diversas e são citadas como o segundo genoma da planta, devido ao seu importante papel na saúde e no desenvolvimento das plantas (ABDELJALIL et al., 2021).

O gênero *Bacillus* é um dos mais estudados e aplicados no controle biológico de fungos, bactérias e nematoides (ABDELJALIL et al., 2021), tanto para doenças de parte aérea como de sistema radicular. A maioria dos produtos bacterianos registrados no Brasil para o controle de doenças de plantas são a base de *Bacillus* (FREIRE et al., 2019). *Bacillus* spp. possuem capacidade de esporulação, o que garante sua prevalência em ambientes variados (GHAZALA et al., 2022) e a formulação de bioprodutos, devido a maior vida de prateleira.

Algumas pesquisas recentes mostram a potencialidade de *Bacillus* spp. em controlar *R. solani*. O pesquisador Ghazala e sua equipe (2022) avaliaram o efeito protetor do biossurfactante de *Bacillus mojavensis* I4 em plantas de batata contra *R. solani*. A inibição do crescimento do micélio de *R. solani* na presença de 5 mg ml⁻¹ de biossurfactantes do isolado I4 foi de cerca de 76%. Em teste de cultura dupla, com 198 isolados bacterianos, 11 inibiram o crescimento de *R. solani* (FARHAOUI, 2023).

2.3 O fitopatógeno *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani, espécie mais importante dentro do gênero *Rhizoctonia*, é um patógeno vegetal fúngico com considerável diversidade em morfologia cultural, gama de hospedeiros e agressividade (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). *R. solani* é um importante fator biótico que resulta em perdas de rendimento em muitas culturas agrícolas importantes (RAZALI et al., 2021).

A infecção de *R. solani* no hospedeiro vegetal ocorre através de hifas (RAZALI et al., 2021). O patógeno é transmitido pelas sementes e pelo solo, onde sobrevive através de escleródios e micélios em sementes infectadas ou no solo em ambientes tropicais (RAFIG et al., 2024).

Os sintomas em diversos hospedeiros incluem podridão de sementes, podridão de raiz, podridão do hipocótilo, podridão da coroa, podridão do caule, podridão dos membros, podridão da vagem, cancro do caule, crosta negra, ferrugem das mudas e apodrecimento pré e pós-emergência (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). Os sintomas nas plantas infectadas podem ser visualizados dentro de 24 a 72 horas após a infecção, dependendo das condições ambientais (SENAPATI et al., 2022).

Diversas práticas de manejo têm sido adotadas para diminuir as perdas de produtividade causadas pelas doenças provocadas pela infecção de *R. solani*., dentre essas, o controle biológico (KIPTOO et al., 2021).

3 METODOLOGIA

3.1 Localização

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus II, localizado no município de Lagoa Seca - PB e na Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Campus VIII em Paulo Afonso – BA.

3.2 Isolamento bacteriano

Amostras de solo da área de cultivo de batata e de plantas de batata agroecológica cultivadas na horta mandala na UEPB, Campus II foram utilizadas para o isolamento das bactérias. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4 °C até o isolamento de acordo com metodologia adaptada de Foysal & Lisa (2018), para o gênero *Bacillus*.

As amostras de solo e da raiz foram pesadas separadamente em 1g cada, e colocadas para secar na estufa a 80°C por 30 min. Após a secagem, as amostras foram transferidas individualmente para tubos Falcon contendo 9 mL de água destilada autoclavada. O material foi agitado com auxílio de Vortex por 1 min e em seguida colocados no banho Maria a 60°C por 30 min. Concluído o tempo, a suspensão foi agitada novamente no Vortex por 1 min para ser realizada a técnica da diluição seriada (10^{-3}). Na sequencia foi transferido 100 µL de cada suspensão diluída para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (AN) e homogeneizado por toda placa com auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. A diluição de cada amostra foi realizada em duplicata. As placas foram acondicionadas em incubadora D.B.O (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C por 48 h.

Para o isolamento bacteriano do tecido vegetal de tubérculos, foi realizada o procedimento para isolamento de bactérias endofíticas. Para tanto, fragmentos de tubérculos de aproximadamente 1cm² foram desinfestadas superficialmente em álcool (70%), durante 1 minuto, hipoclorito de sódio (1%) por 3 minutos, novamente com álcool 70% por 1 min, seguido por lavagem em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, 1 g de tecido vegetal foi adicionado em tubos Falcon contendo 9 mL de água destilada autoclavada, procedendo-se a diluição seriada (até 10^{-9}) e plaqueamento com a mesma metodologia descrita para o isolamento de solo rizosférico e raiz.

Após a incubação, as colônias bacterianas foram contabilizadas e isoladas de acordo com a morfologia e coloração características do gênero *Bacillus* spp. As colônias foram purificadas de acordo com a semeadura por esgotamento e técnica de estria simples utilizando meio de cultura AN e acondicionadas em incubadora D.B.O. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C por 48h.

3.3 Teste de Gram

Uma pequena amostra de cada colônia bacteriana isolada foi fixada com a utilização da chama, numa lâmina para microscópio. Após este processo foi adicionado corante violeta cristal por 60 s e posteriormente lavado com esguicho de água destilada. Em seguida foi aplicado o Lugol por 60 s e lavada com esguicho de água destilada. Na sequência, as células foram descoradas com álcool a 95% por 20 s e lavadas com esguicho de água destilada. Após a lavagem, as células foram coradas com fucsina por 30 segundos, lavadas com água destilada e observadas no microscópio para a identificação das bactérias, como Gram positivas ou Gram negativas.

As colônias bacterianas selecionadas de acordo com as características do gênero *Bacillus* foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura NA, cobertas com óleo mineral e acondicionadas a 4 °C.

3.4 Antibiose das bactérias a *Rhizoctonia solani* in vitro.

O pareamento de 19 isolados bacterianos com *R. solani* (isolado de batata RHIZ 117) foi avaliado utilizando placas de Petri de 11 cm de diâmetro contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA). O fungo foi repicado em meio BDA, oito dias antes da instalação do experimento. As colônias das bactérias foram cultivadas em meio NA por 48 horas antes do pareamento. Um disco contendo o crescimento micelial do patógeno, com 9 mm de diâmetro, foi colocado na placa de Petri e no outro lado da mesma placa foi feito uma estria de 1 cm da bactéria, ambos a 0,5 cm da borda da placa. Para o tratamento testemunha, utilizou-se apenas o patógeno na placa. As placas foram colocadas em BOD a 25°C e o crescimento micelial de *R. solani* foi avaliado após três dias de incubação, por meio do diâmetro médio das colônias do patógeno, medidos em dois sentidos perpendiculares com o auxílio de uma régua. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

3.5 Solubilização de fósforo e potássio

O meio utilizado para avaliação da solubilização de fósforo (P) foi o Agar Pikovskaya e para potássio (K) o Aleksandrow Agar. Os sete isolados bacterianos foram utilizados antes de completar 48 horas de crescimento em meio Ágar Nutriente (NA). As placas foram divididas em quatro partes, e uma pequena quantidade de cada bactéria foi depositada no centro de cada divisão, utilizando uma alça bacteriológica esterilizada. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 30 °C por oito dias. A avaliação foi realizada por observação visual, verificando se ao redor das colônias houve formação de uma zona transparente, indicando capacidade de solubilização de P ou de K. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 2 repetições para cada tratamento.

3.6 Fixação de Nitrogênio

Inicialmente, 10 mL do meio Buek's foram distribuídos em tubos de ensaio, os quais foram tampados com algodão e autoclavados. Após o resfriamento, utilizando um pipetador, foram adicionados 100µL de cada bactéria cultivada anteriormente em meio Trypticase Soy Broth (TSB) líquido no centro do meio Buek's, deixando-os se espalhar até atingir o topo, seguindo um procedimento triplicado para cada organismo. Todos os tubos foram novamente tampados com algodão e armazenados em temperatura ambiente, sendo avaliados após sete dias. As avaliações consistiram na observação do desenvolvimento de halo nas três amostras, comparando-as com uma testemunha. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com 3 repetições para cada tratamento.

3.7 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Sisvar e os resultados submetidos aos testes de normalidade dos resíduos por Shapiro-Wilk. Os dados com distribuição normal e homocedasticidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p \leq 0,05$) com as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Isolamento bacteriano

Das varias amostras de solo coletadas foi possível isolar diversas unidades formadoras de colônias (UFC), conforme demonstrado na figura 1.

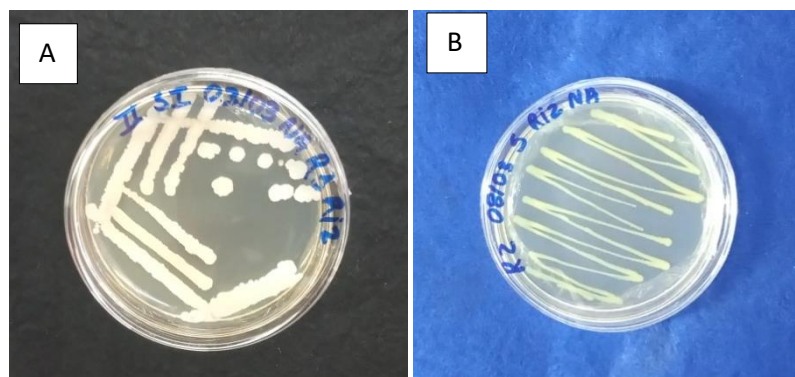
Figura 1: Placa de Petri com Unidades Formadoras de Colônias (UFC) oriundas do solo da horta mandala.



Fonte: Sayonara Duarte, 2024.

Após um rigoroso processo de identificação dos microrganismos presentes, foram empregadas duas técnicas de semeadura, a primeira por esgotamento para purifica e a segunda estria simples para cultivar (Figura 2). O resultado desse procedimento foi a obtenção de colônias com crescimento bacteriano típico do gênero *Bacillus* spp.

Figura 2: Técnicas de semeadura. (A) esgotamento e (B) estria simples.



Fonte: Sayonara Duarte, 2024.

Foram obtidos um total de 19 isolados bacterianas com características distintas (Tabela 1). A caracterização foi realizada por meio do teste de Gram, demonstrando que todos os isolados foram Gram positivos.

Tabela 1. Isolados bacterianos utilizados da horta mandala.

Isolado	Origem
CFB ¹ 001	Rizosfera
CFB 002	Solo rizosférico
CFB 004	Raiz
CFB 006	Raiz
CFB 007	Raiz
CFB 008	Raiz
CFB 010	Raiz
CFB 011	Raiz
CFB 020	Raiz
CFB 021	Raiz
CFB 022	Raiz
CFB 023	Tecido vegetal do caule
CFB 024	Tecido vegetal do caule
CFB 025	Tecido vegetal do tubérculo
CFB 026	Tecido vegetal do tubérculo
CFB 027	Tecido vegetal do tubérculo
CFB 030	Tecido vegetal do tubérculo
CFB 064	Tecido vegetal do tubérculo
CFB 065	Tecido vegetal do tubérculo

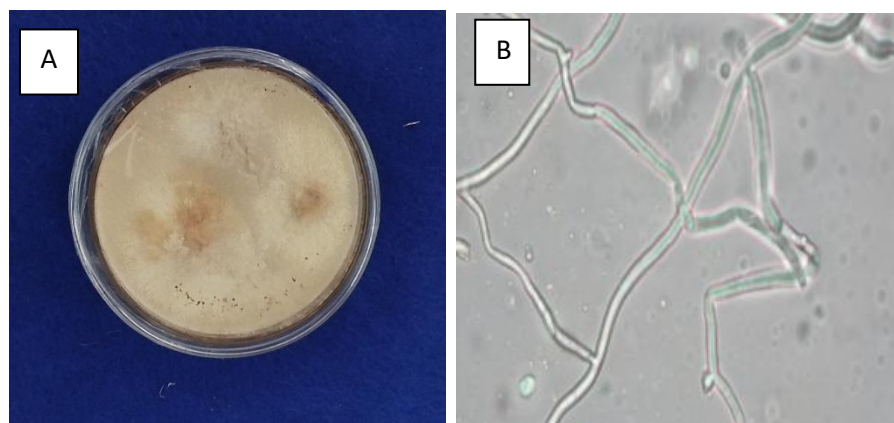
¹CFB – Coleção Fitopatológica de Bactéria.

4.2 Antibiose das bactérias a *Rhizoctonia solani* *in vitro*.

A testemunha, representada pelo crescimento de *R. solani* (Figura 3 - A e B) sem os isolados bacterianos, exibiu um crescimento vigoroso, cobrindo completamente a placa em 48 horas. *Rhizoctonia solani* trata-se de um fungo que ocorre no solo, sendo caracterizado como um patógeno de alta virulência. Segundo Mirsam et al. (2023) é um fungo complexo com

vários grupos genéticos, suas hifas se expandem, aumentando a diversidade genética ao fundirem-se entre si.

Figura 3: *Rhizoctonia solani* (A) Testemunha e (B) Hifas do fungo.



Fonte: Sayonara Duarte, 2024.

Tabela 2: Crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* após três dias de pareamento com isolados bacterianos.

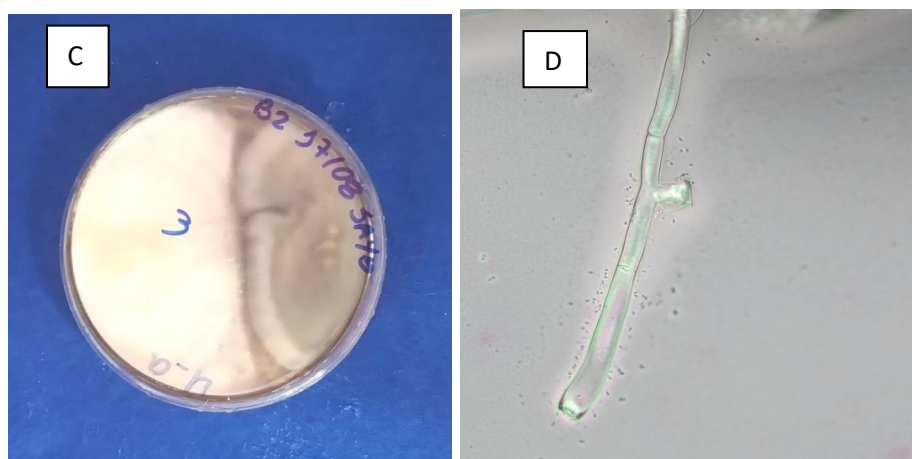
Tratamento	Crescimento micelial
Testemunha	9,34 e
CFB 011	8,00 d
CFB 010	7,91 d
CFB 006	7,80 d
CFB 008	7,68 d
CFB 007	7,49 c
CFB 004	7,31 c
CFB 001	7,27 c
CFB 002	7,27 c
CFB 021	7,11 c
CFB 020	6,96 c
CFB 026	6,16 b
CFB 022	5,76 b
CFB 023	6,28 b
CFB 024	6,11 b

CFB 025	5,96 b
CFB 027	6,05 b
CFB 030	4,68 a
CFB 064	6,17 b
CFB 065	6,51 b
CV %	6,16

Valores seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% significância.

De maneira oposta a testemunha, observou-se uma notável redução no desenvolvimento da *R. solani* ao ser cultivado em conjunto com algumas bactérias isoladas do tecido vegetal da batateira, solo e da rizosfera. A bactéria CFB 030, isolada a partir do tecido vegetal do tubérculo, teve a menor média, mostrando significativamente diferença de todos os outros tratamentos e maior antibiose ao patógeno (Figura 4 e Tabela 2).

Figura 4: Crescimento de *Rhizoctonia solani* pareado com a bactéria CFB 030 (C) e hifa do fungo e células bacterianas próximas a hifa (D).



Fonte: Sayonara Duarte, 2024.

Diversas pesquisas têm demonstrado a eficiência de determinadas bactérias em reduzir o desenvolvimento de fungos patogênicos. *Rhizoctonia solani* causa doenças graves em plantas, infectando uma ampla variedade de hospedeiros. No estudo desenvolvido por Farhaoui et al. (2023), com o objetivo de selecionar bactérias antagonistas que pudessem ser utilizadas para controle biológico contra *R. solani* AG-2-2, um conjunto de 198 cepas

bacterianas foi testado, por meio do teste de cultura dupla *in vitro*. Destes, onze isolados demonstraram atividade antifúngica contra o patógeno.

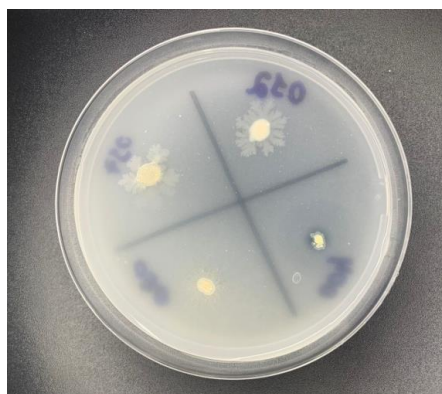
Em trabalho realizado por Hussain e Khan (2020) foi testado uma nova cepa de *Bacillus subtilis* hussain T-AMU, produtor de biossurfactante, e seu filtrado de cultura contra *R. solani*. Os autores observaram inibição significativa do crescimento do micélio do patógeno em comparação com o controle pelo método de pareamento (HUSSAIN & KHAN, 2020).

Já Almeida e colaboradores (2023) avaliaram *in vitro* o antagonismo de *Bacillus velezensis* LABIM40 contra *Alternaria linariae*, *Botryotinia squamosa*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Gibberella zeae* e *R. solani*. No teste de pareamento, *B. velezensis* LABIM40 inibiu em 46,6%, 67,4%, 64,7%, 49% e 54,4% o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos testados, respectivamente.

4.3 Solubilização de fósforo e potássio

As avaliações foram realizadas visualmente para verificar se a área ao redor de algum microrganismo ficou transparente. Entre os sete isolados testados, apenas a CFB 004 mostrou capacidade de solubilizar o fósforo, porém não apresentou solubilização de potássio. As demais cepas não apresentaram respostas positivas em nenhum dos testes realizados (Tabela 3).

Figura 5: Placa com meio de cultivo para solubilizar fósforo



Fonte: Sayonara Duarte, 2024.

A baixa disponibilidade de nutrientes no solo pode ser um problema significativo para a agricultura e a saúde das plantas. Na natureza, o fósforo é um dos macronutrientes mais

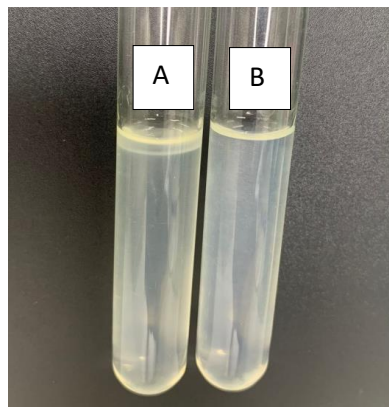
limitantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas (KOUR et al., 2020). Além disso, a concentração de potássio solúvel no solo é normalmente muito baixa, já que mais de 90% do potássio está presente na forma de rochas insolúveis e minerais de silicato, que são difíceis de serem absorvidos diretamente pelas plantas (JIAO et al., 2023). Esses desafios na disponibilidade de nutrientes essenciais destacam a necessidade de estratégias eficazes para melhorar a nutrição das plantas, como o uso de microrganismos solubilizadores de nutrientes.

Na pesquisa realizada por Li et al. (2023) foi proposto a utilização integrada de bactérias acumuladoras de fósforo e bactérias solubilizadoras de fósforo para atingir o objetivo de diminuir a lixiviação de P e, ao mesmo tempo, melhorar os níveis de P disponível no solo. O resultado mostrou que a inoculação destas bactérias melhorou o teor de P disponível no solo em 18,3%. O estudo conduzido por Sun e colaboradores (2020) teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias solubilizadoras de potássio. Eles conseguiram isolar 26 cepas, das quais 18 demonstraram a capacidade de solubilizar potássio. A integração dessas bactérias no manejo agrícola pode contribuir substancialmente para a melhoria da fertilidade do solo.

4.4 Fixação de Nitrogênio

As amostras foram avaliadas oito dias após a montagem do experimento, utilizando observações visuais para identificar a formação de halo na superfície do meio (Figura 6). Dos testes realizados, seis isolados (CFB 001, CFB 004, CFB 008, CFB 020, CFB 030 e CFB 065) demonstraram capacidade de fixar nitrogênio, com exceção da CFB 007, conforme detalhado na Tabela 3.

Figura 6: Tubos com meio de cultivo para fixação de nitrogênio. Tratamento CFB 012 (A) e testemunha (B)



Fonte: Sayonara Duarte, 2024.

O nitrogênio é um macronutriente muito importante para o desenvolvimento das plantas. Embora o nitrogênio seja abundante na atmosfera, as plantas ainda são incapazes de utilizá-lo, devido à forte ligação covalente tripla que o mantém unido em sua forma molecular (N_2) (JIAO et al., 2023). Os microrganismos têm impacto direto sobre a produtividade vegetal, e dentre estes podemos citar as bactérias que são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e disponibilizar para as plantas em um processo conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (FERREIRA et al., 2023).

Balbinot et al. (2020) testaram cinco isolados da rizosfera de alho para fixação de nitrogênio em milho dos quais quatro demonstraram resultados significativos para essa fixação. Outros estudos exploratórios recentes relatam a capacidade dos microrganismos em disponibilizar nitrogênio para as plantas (SU et al., 2024; DOS SANTO et al. 2023; OKTARI et al., 2021). Diversas pesquisas contínuas sobre a utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio podem levar a avanços significativos na agricultura sustentável.

Tabela 3: Solubilização de Fósforo e Potássio e fixação de Nitrogênio em bactérias isoladas da horta mandala.

Bactérias	Fósforo	Potássio	Fixação de Nitrogênio
CFB 001	-	-	+
CFB 004	+	-	+
CFB 007	-	-	-
CFB 008	-	-	+
CFB 020	-	-	+
CFB 030	-	-	+
CFB 065	-	-	+

5 CONCLUSÃO

Os isolados Gram positivos mostraram capacidade de controle do fungo fitopatogênico *R. solani* (CFB 030), solubilização de fósforo (CFB 004) e fixação de nitrogênio atmosférico (CFB 001, CFB 004, CFB 008, CFB 020, CFB 030 e CFB 065).

REFERÊNCIAS

- ABDELJALIL, N. O.; VALLANCE, J.; GERBORE, J.; YACOUB, A.; DAAMI-REMADI, M.; REY, P. Combining potential oomycete and bacterial biocontrol agents as a tool to fight tomato Rhizoctonia root rot. **Biological Control**, volume 155, April 2021.
- AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. Rhizoctonia solani: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant pathology**, v. 67, n. 1, p. 3-17, 2018.
- ALMEIDA, P. S. de.; BAPTISTA, J. P.; HIGASHI, A. Y.; TEIXEIRA, G. M.; ALMEIDA, L. H. C. de.; JUNIOR, A. G. de O.; BALBI-PENA, M. I. In vitro control of phytopathogenic fungi and damping-off of tomato by *Bacillus velezensis* LABIM40 (CMRP 4489). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 44, n. 3, p. 1077-1096, 2023.
- ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A. Biological controlo f root rot disease-causing Rhizoctonia solani in tomate plant by na endophytic fungs and analysis of growth promoting activities in greenhouse and field. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, volume 127, September 2023.
- AYDIN, M. H. Rhizoctonia solani and its biological control. **Turkiye Tarimsal Arastirmalar Dergisi**, v. 9, n. 1, p. 118-135, 2022.
- BALNINOT, G. G.; RODRIGUES, S.; BOTELHO, G. R.; Isolates of *Bacillus* sp. from garlic: effect on corn development and plant growth-promoting mechanisms. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 44, 2020.
- DANESH, Y. R.; PELLEGRINI, M. AKKOPRU, A.; FARDA, B.; BOYNO, G.; DJEBAILI, R. Chapter 7 – Plant growth-promoting rhizobacteria: their potential as biological control agents in sustainable agriculture. **Sustainable Agricultural Practicess Plant and Soil Microbiome**, 2024, pages 145 – 159.
- DIAS, D. S. B. Aplicação de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) com viés biotecnológico: Ênfase na produção por *Paenibacillus*. Rio de Janeiro: CETEM/MCTIC, 2019, 56 p.
- DIAZ, P. A. E. Concentration effect on endophytic establishment of plant growth-promoting microorganisms. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2022.
- DIMKIC, I.; JANAKIEV, T.; PETROVIC, M.; DEGRASSI, G.; FIRA, D. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms – A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, volume 117, January 2022.
- DOS SANTOS, R.; GRZEGOZEWSKI, D. M.; DE AZEVEDO, A. R.; DE AZEVEDO, R. P.; DE AZEVEDO, C. A. R.; ZILLES, F. K. da S. Avaliação do inoculante BR 29+ BR 10141+ BR 10788 (*Bradyrhizobium elkanii* + *Bacillus subtilis* + *Paraburkholderia nodosa*) na promoção do crescimento na cultura as soja (*Glycine Max*). **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 11, 2023.

FARHAOUI, A.; ALAMI, N. E.; KHADIRI, M.; EZRARI, D.; RADOUANE, N. BAALA, M.; TAHIRI, A.; LAHLALI, R. Biological control of diseases caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, volume 124, march 2023.

FERREIRA, J. S.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Ecosystem services in the agriculture: the contribution of diazotrophic bacteria in association with Rice. **Floresta e Ambiente**, v. 15 p. 35-39, 2023.

FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S. P.; SUJII, E. R. Estratégias de uso e histórico. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle Biológico de Pragas da Agricultura. **Editoras técnicas**. – Brasília, DF : Embrapa, 2020.

FREIRE, E. S.; SILVA, A. J. S. da; BRAZ, G. B. P.; DILVA, J. C. P. Controle Biológico de doenças de plantas: Conveito, desafios e perspectivas. 12º Encontro Nacional Sobre Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas, fevereiro, 2019.

GHAZALA, I.; CHARFEDDINE, M.; CHARFEDDINE, S.; HADDAR, A.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GARGOURI-BOUZID, R. Lipopeptides from *Bacillus mojavensis* 14 confer induced tolerance toward *Rhizoctonia solani* in potato (*Solanum tuberosum*). **Physiological and Molecular Plant**, volume 121, September 2022.

HUSSAIN, T.; KHAN, A. A. *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its Antifungal activity against Potato Black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, volume 23, January 2020.

JIAO, H.; WANG, R.; QIN, W.; YANG, J. Screening of rhizosphere nitrogen fixing, phosphorus and potassium solubilizing bacteria of *Malus sieversii* (Ldb.) Roem. And the effect on apple growth. **Journal of Plant Physiology**, volume 292, January 2024.

KIPTOO, J. J.; ABBAS, A.; BHATTI, A. M.; USMAN, H. M.; SHAD, M. A.; UMER, M.; ATIQ, M. N.; ALAM, S. M.; ATEEQ, M.; KHAN, M.; PERIS, N. W.; RAZAQ, Z.; ANWAR, N.; IQBAL, S. RHIZOCTONIA SOLANI OF POTATO AND ITS MANAGEMENT: A REVIEW. **Plant Protection**, 2021.

KOUR, D.; RANA, K. L.; YADAV, A. N.; YADAV, N.; KUMAR, M.; KUMAR, V.; VYAS, P.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K.; Microbial biofertilizers: bioresources and eco-friendly Technologies for agricultural and environmental sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, volume 23, January 2020.

LI, Z.; WANG, Y.; LIU, Z.; HAN, R.; CHEN, S.; ZHOU, W.; Integrated application of phosphorus-accumulating bacteria and phosphorus-solubilizing bacteria to achieve sustainable phosphorus management in saline soils. **Science of the Total Environment**, volume 885, August 2023.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. C. Microbial biotechnology: inoculation, mechanisms of action and benefits to plants Biotecnología microbiana: inoculación, mecanismos de acción y beneficios de las plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n.12, e356101220585, 2021.

MICHEREFF, S. J. CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS. Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Fitopatologia I**, 2008.

OKTARI, I.; MUSTAMU, N. E.; WALIDA, H. Ultisol fertility and morphological characteristics of nitrogen-fixing bacteria from oil palm rhizosphere. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 09 December 2021, Vol. 51.

PAZ, I. C. P. BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE EUCALIPTO E POTENCIAL USO NO CONTROLE DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS EM VIVEIRO FLORESTAIS. Tese de Doutorado em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, setembro 2009.

RAFIQ, M.; SHOAIB, A.; JAVAID, A.; PERVEEN, S.; UMER, M.; ARIF, M.; CHENG, C. Exploration of Resistance Level Against Black Scurf Caused by *Rhizoctonia solani* in Different Cultivars of Potato. **Plant Stress**, Available online may 2024.

RAHMAN, M. T.; RUBAYET, M. T.; BHUIYAN, M. K. A. Integrated management of rhizoctonia root rot disease of soybean caused by *Rhizoctonia solani*. **Nippon Journal of Environmental Science**, v. 1, n. 7, p. 1018, 2020.

RAZALI, N. M.; HISHAM, S. N.; KUMAR, I. S.; SHUKLA, R.N.; LEE, M.; BAKAR, M. F. A.; NADARAJAH, K. Comparative Genomics: Insights on the Pathogenicity and Lifestyle of *Rhizoctonia solani*. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 4, 2021.

SENAPATI, M.; TIWARI, A.; SHARMA, N.; CHANDRA, P.; BASHYAL, B. M.; ELLUR, R. K.; BHOWMICK, P. K.; BOLLINEDI, H.; VINOD, K.; SINGH, A. K.; KRISHNAN, S. G. *Rhizoctonia solani* Kühn Pathophysiology: Status and Prospects of Sheath Blight Disease Management in Rice. **SYSTEMATIC REVIEW article Front. Plant Sci.**, 02 May 2022.

SOUZA, L. O. P. de.; SOUZA, J. P. de. AGRICULTURA ORGÂNICA: UMA ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, A AGRICULTURA FAMILIAR E A SEGURANÇA ALIMENTAR. In: OLIVEIRA, R. J. de. EXTENSÃO RURAL: PRÁTICAS E PESQUISAS PARA O FORTALECIMENTO DA AGRICULTURA FAMILIAR - VOLUME 1. **Editora Científica**, edição 1, 2021.

SU, Y.; WANG, Y. R.; LIU, G. Q.; ZHANG, Z.; LI, X.; CHEN, G.; GOU, Z.; GAO, Q. Nitrogen (N) “supplementation, slow release, and retention” strategy improves N use efficiency via the synergistic effect of biochar, nitrogen-fixing bacteria, and dicyandiamide. **Science of The Total Environment**, volume 908, January 2024.

SUN, F.; OU, Q.; WANG, N.; GUO, Z. X.; OUA, Y.; LI, N.; PENG, C. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. **Global Ecology and Conservation**, volume 23 2020.

VANDANA.; PRIYADARSHANEE, M.; DAS, SURAJIT. Bacterial extracellular polymeric substances: Biosynthesis and interaction with environmental pollutants. **Chemosphere**, volume 332, August 2023.

ZENG, W.; LI, F.; WU, C.; YU, R.; WU, X.; SHEN, L.; LIU, Y.; QIU, G.; LI, J. Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus* SP. S3 to multiple heavy metals. **Research Paper**, volume 43, 2020.

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agropecuária. Acesso em: <https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=senso+agropecuario+2022> Acesso em: 11 mar. 2024.