

Universidade Estadual do Norte do Paraná

Repositório Institucional UENP

<https://repositorio.uenp.edu.br>

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Dissertações

2018-02-28

Potencial antagonista de filtrados de bactérias cavernícolas contra fungos fitopatogêni

Marques, Rodrigo Domiciano

Universidade Estadual do Norte do Paraná

MARQUES, Rodrigo Domiciano. Potencial antagonista de filtrados de bactérias cavernícolas contra fungos fitopatogênico. Orientador: Leopoldo Sussumu Matsumoto. 2018. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Campus Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2018.

<https://repositorio.uenp.edu.br/handle/123456789/475>

Baixado de Repositório Institucional UENP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

RODRIGO DOMICIANO MARQUES

**POTENCIAL ANTAGONISTA DE FILTRADOS DE
BACTÉRIAS CAVERNÍCOLAS A FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2018**

RODRIGO DOMICIANO MARQUES

**POTENCIAL ANTAGONISTA DE FILTRADOS DE
BACTÉRIAS CAVERNÍCOLAS A FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Agronomia, da Universidade Estadual do
Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientador: Prof. Dr. Leopoldo Sussumu
Matsumoto

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP**

M537p Marques, Rodrigo Domiciano
Potencial antagonista de filtrados de bactérias
cavernícolas a fungos fitopatogênicos / Rodrigo
Domiciano Marques; orientador Leopoldo Sussumu
Matsumoto - Bandeirantes, 2018.
56 p. :il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2018.

1. Bioprospecção. 2. Fusarium solani. 3.
Macrophomina phaseolina. 4. Sclerotinia
sclerotiorum. 5. Antimicrobianos. I. Matsumoto,
Leopoldo Sussumu, orient. II. Título.

CA110.1.3.4.12.2

RODRIGO DOMICIANO MARQUES

**POTENCIAL ANTAGONISTA DE FILTRADOS DE
BACTÉRIAS CAVERNÍCOLAS CONTRA FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: 28/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto

UENP

Prof.^a Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

UEL

Prof. Dr. Luis Eduardo Azevedo Marques Lescano

UENP

Prof.^a Dr. Marcos Pileggi

UEPG

Prof.^a Dr.^a Christiane Luciana da Costa

UENP

Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto
Orientador
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Mengehel

DEDICATÓRIA

Ao meu sobrinho Joaquim Bittencourt Marques.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, João Vicente, e minha mãe, Luci, por todo apoio e amor demonstrados desde sempre.

Aos meus irmãos, João André e Heloísa, pelo carinho da irmandade.

Aos meus familiares que sempre me incentivaram e torceram por mim.

A Luiz Felipe dos Santos Sanches Ribeiro, pela compreensão e companheirismo ao longo dessa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto, pela oportunidade, confiança e ensinamentos oferecidos.

À banca examinadora pelos comentários sempre bem-vindos.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo da UENP/CLM, Paula, Jorge, Luiz Eduardo, Gabriel, Fabiano, Gilberto, Giovana, Mathilde e especialmente aos estagiários Ana Carolina, Gleice, Felipe e Cassia pela enorme ajuda indispensável na execução dos experimentos.

Aos meus amigos Maria Eliza, Gabriela, Flavia, Jociane, Marli, Matheus, Maurílio e Mariana, que mesmo distantes não se tornaram ausentes.

À secretária do Programa de Mestrado em Agronomia da UENP/CLM, Sônia, e aos estagiários Mariany e Lucas.

Aos meus professores e colegas de turma do Programa de Mestrado em Agronomia da UENP/CLM.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*“Não pare na pista
É muito cedo
Pra você se acostumar
Amor não desista
Se você pára
O carro pode te pegar”*

(Paulo Coelho de Souza, Raul Santos Seixas)

MARQUES, R. D. **Potencial antagonista de filtrados de bactérias cavernícolas a fungos fitopatogênicos**: 2018. 56f. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, Bandeirantes, 2018.

RESUMO

Cavernas são ambientes isolados com limitações de luz e nutrientes, portanto o metabolismo possivelmente diferenciado de microrganismos cavernícolas vem sendo explorado para diversas finalidades, como o uso de metabólitos secundários com atividade antagonista a fungos fitopatogênicos. O objetivo deste estudo foi verificar o potencial inibidor de filtrados de bactérias cavernícolas a fungos fitopatogênicos e sua relação com a atividade de enzimas líticas. Foram produzidos filtrados a partir do cultivo de dez isolados de bactérias cavernícolas em caldo nutriente, em diferentes tempos de cultivo, com a finalidade de determinar o melhor tempo na produção de compostos bioativos. Os filtrados foram testados em meio Mueller-Hinton e BDA contra *Fusarium solani* (F1 e F2), *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Foi avaliado, também, o efeito do cocultivo dos isolados bacterianos com os respectivos fungos. Foram analisados o diâmetro médio das colônias, porcentagem de inibição do crescimento micelial, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a atividade de amilases, celulases, proteases, endoglucanases e pectinases. Os filtrados de bactérias cavernícolas produzidos em monocultivo apresentaram potencial antagonista aos fungos *Fusarium solani* F1 e F2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A porcentagem de inibição do crescimento micelial é dependente do isolado utilizado, do tempo de cultivo e do alvo escolhidos. Os filtrados contêm, além de compostos com características antifúngicas, enzimas líticas que foram correlacionadas com a redução do IVCM de *Fusarium solani* F1. O efeito do cocultivo de bactérias cavernícolas com os fungos testados é dependente da combinação entre o fitopatógeno e o isolado bacteriano. A atividade enzimática dos filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo com os fungos testados foi alterada. Não é obrigatória a alta atividade de enzimas líticas nos filtrados bacterianos para que inibição seja observada.

Palavras-chave: bioprospecção, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, metabólitos secundários, *Sclerotinia sclerotiorum*.

MARQUES, R. D. **Antagonist potential of filtrates of cave bacteria against phytopathogenic fungi**: 2018. 56p. Dissertation for Master's degree in Agronomy - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, Bandeirantes, 2018.

ABSTRACT

Caves are isolated environments with limitations of light and nutrients, so the possibly differentiated metabolism of cave bacteria is being explored for several purposes, such as the use of secondary metabolites with phytopathogenic fungi antagonistic activity. The aim of this study was verifying the antagonist potential of filtrates of cave bacteria against phytopathogenic fungi and its relation to lytic enzymatic activity. Filtrates were produced from the culture of ten isolates of cave bacteria in nutrient broth at different culture times, in order to determine the best time in the production of bioactive compounds. The filtrates were tested on Mueller-Hinton and BDA media against *Fusarium solani* (F1 and F2), *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The colony diameter, percentage of mycelial growth inhibition, mycelial growth rate and the activity of amylases, cellulases and proteases were evaluated. The antagonistic potential of filtrates from coculturing cave bacteria with fungi was also evaluated. The filtrates of cave bacteria produced in monoculture presented antagonistic potential to fungi *Fusarium solani* F1 and F2, *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Percentage of mycelial growth inhibition is dependent on the isolate used, the culture time and the target chosen. The filtrates contain, in addition to compounds with antifungal characteristics, lytic enzymes that were correlated with the reduction of mycelial growth rate of *Fusarium solani* F1. The cocultivation of cave bacteria with the fungi tested is dependent on the combination of phytopathogen and bacterial isolate. Filtrates enzymatic activity was altered by cocultivation with fungi. High enzymatic activity is not mandatory for filtrates antagonistic potential to be observed.

Keywords: *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, screening, secondary metabolites

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORIGEM BACTERIANA	8
2.2	RISCOS NO USO DE PRODUTOS NATURAIS	11
2.3	MICROBIOLOGIA EM CAVERNAS	12
2.4	FUNGOS E DOENÇAS DE PLANTAS CULTIVADAS	13
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	BACTÉRIAS CAVERNÍCOLAS	16
4.2	PARTE I – FILTRADOS DE MONOCULTIVO BACTERIANO	16
4.2.1	Cultivo contínuo e curva de crescimento	16
4.2.2	Produção dos filtrados	18
4.2.3	Produção de inóculo de fungos fitopatogênicos	19
4.2.4	Experimento I - Difusão em ágar Mueller-Hinton	19
4.2.5	Experimento II - Inibição em BDA	20
4.3	PARTE II - FILTRADOS DE COCULTIVO BACTERIANO E FÚNGICO	20
4.3.1	Inoculação das bactérias	20
4.3.2	Inoculação dos fungos	21
4.3.3	Produção dos filtrados	22
4.3.4	Experimento III - Difusão em ágar Mueller-Hinton	22
4.4	PARTE III – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FILTRADOS BACTERIANOS	22
4.5	AVALIAÇÕES	23
4.5.1	Diâmetro de colônia	23
4.5.2	Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC)	24
4.5.3	Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)	24
4.5.4	Atividade enzimática	24
4.5.5	Análises estatísticas	25
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.6	CURVAS DE CRESCIMENTO	26

4.7	PARTE I – FILTRADOS DE MONOCULTIVO BACTERIANO.....	27
4.7.1	Difusão em Ágar Mueller-Hinton.....	27
4.7.2	Inibição em BDA.....	32
4.8	PARTE II – FILTRADOS DE COCULTIVO BACTERIANO E FÚNGICO	38
4.9	PARTE III – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FILTRADOS BACTERIANOS.....	45
5	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Moléculas oriundas de microrganismos, como metabólitos secundários, podem ter importância agrônômica, como a ação inibitória do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (COMPANT et al., 2013). Uma vez que o metabolismo microbiano é alterado em função do meio onde os organismos se encontram, ambientes com condições adversas constituem uma importante fonte de material a ser estudado (CRANEY; AHMED; NODWELL, 2013).

Cavernas são ambientes isolados com limitações de luz e nutrientes, portanto o metabolismo possivelmente diferenciado de microrganismos cavernícolas vem sendo explorado para diversas finalidades, desde a descoberta de novas drogas para medicina até seu potencial uso na agricultura (AXENOV-GIBANOV et al., 2016; BARTON; NORTHUP, 2007 GHOSH et al., 2017b).

À essa investigação da utilidade de microrganismos ou suas moléculas é dado o nome de bioprospecção, que emprega técnicas como os ensaios de antibiose ou inibição, nos quais os patógenos de interesse são confrontados com o microrganismo ou molécula em estudo (CHARLOP-POWERS et al., 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORIGEM BACTERIANA

Os produtos finais do metabolismo primário são universais aos microrganismos, e possuem características como serem destinados à construção de moléculas ou organelas com função celular ou desempenham funções na produção e obtenção de energia. Assim, não ocorre acúmulo de metabólitos primários nas células de microrganismos com o metabolismo regulado. Contudo, alguns microrganismos possuem genes para a produção de outros metabólitos além daqueles necessários para seu desenvolvimento, e uma vez que a fase exponencial de crescimento termina, alguns produtos e subprodutos do metabolismo primário não têm destino nas vias metabólicas que não são mais necessárias e passam a serem acumulados na célula. Dessa forma, vias de síntese de moléculas não essenciais à vida são ativadas sob estresse metabólico, gerando produtos de metabolismo secundário, possibilitando a excreção do material acumulado e reequilíbrio bioquímico das células (MALIK, 1980).

Os metabólitos secundários, como são conhecidas essas moléculas, não possuem funções essenciais ao desenvolvimento microbiano, porém apresentam vantagens como ação antagonista a outros microrganismos, garantindo sua sobrevivência em condições de competição (BERDY, 2005).

Os tipos de metabólitos secundários não são comuns a todos os microrganismos, inclusive indivíduos dentro de um mesmo gênero podem excretar moléculas de natureza diferente, ao passo que uma mesma molécula pode ser produzida por estirpes de outras espécies (KAI et al., 2006).

A diversidade estrutural dos metabólitos secundários advém da capacidade de síntese bioquímica dos microrganismos, a partir do mesmo código genético. Isso é explicado pelo processo de formação das moléculas, que pode envolver a junção de subprodutos, a alteração no posicionamento dos átomos ou a adição de novos elementos à estrutura molecular, resultando em novas funções bioquímicas (ONGENA; JACQUES, 2007).

Apesar das reações bioquímicas na produção de metabólitos secundários serem semelhantes àquelas usadas no metabolismo primário, cada metabólito é produzido por uma via de síntese específica, regulada por enzimas, precursores e cofatores envolvidos em

reações ao longo de várias fases. Enzimas com ação no metabolismo primário evoluíram para a transformação de substratos muito específicos, já que os produtos dessas reações são essenciais à vida. Por outro lado, as enzimas com ação no metabolismo secundário não sofreram níveis tão particulares de seleção, ou seja, ocorre menor restrição quanto à natureza dos substratos transformados pelas vias do metabolismo secundário, o que contribui para a diversificação de moléculas produzidas (MALIK, 1980). A probabilidade de novas moléculas com bioatividade eficaz é maior entre produtos naturais do que entre produtos desenhados por técnicas de química recombinatória (BERDY, 2005).

A concentração de nutrientes específicos ao longo do crescimento microbiano reflete na expressão gênica que regula a produção de metabólitos secundários, ou seja, a produção de moléculas ocorre em fases específicas de crescimento, predominantemente após a fase logarítmica, quando o crescimento rápido já ocorreu e atinge-se estabilidade. Os processos de biossíntese estão relacionados a enzimas alostéricas e genes organizados em operons (LIGON et al., 2000).

O potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários é explorado para uso humano desde a descoberta dos antibióticos, responsáveis por salvarem inúmeras vidas. Hoje, seu uso e estudo abrangem diversas áreas além da farmácia e medicina, como a indústria e a agricultura (DAVIES, 2012). Ao fim de 2002, mais de 22000 metabólitos secundários foram reportados pela comunidade científica, contudo obviamente um número bem menor de compostos é de ação satisfatória, e cerca de apenas 150 produtos são usados na medicina humana e veterinária e na agricultura (BERDY, 2005). Dentre os metabólitos secundários, o grande número de antibióticos descobertos é justificado pelo fato de que apenas esse tipo de composto foi por muito tempo objeto de estudo de interesse (DAVIES, 2012).

Estudos de metagenômica e sequenciamento de DNA genômico podem expor o potencial de produção de biomoléculas ativas até então escondido, por revelar cluster gênicos responsáveis pela produção de metabólitos anteriormente não associados aos organismos estudados ou não detectados por métodos convencionais de cultivo e bioprospecção (DAVIES, 2012). Tais vias de metabolismo são chamadas vias silenciosas, as quais vão além dos operons envolvidos na produção de peptídeos não ribossômicos (NRPS) e policetídeos (PKS). A metagenômica aplicada à produção de metabólitos secundários é atualmente a técnica mais promissora para guiar os estudos de bioprospecção por indicar o caminho a ser seguido que é potencialmente mais produtivo na descoberta de material inédito.

O cocultivo é a técnica de cultivo onde dois ou mais microrganismos são cultivados em conjunto em meios de cultura líquidos. Atualmente se constitui em uma

metodologia simples para a potencial descoberta de metabólitos secundários regulados por vias silenciosas. Wakefield et al. (2017) descrevem que são consideradas duas situações: I – o cocultivo simula condições naturais de competição, permitindo a expressão gênica para a produção de moléculas de defesa; ou II – a produção enzimática do organismo indutor provoca a liberação de metabólitos secundários pelo organismo produtor por servir de regulador ou precursor, ou ainda que o organismo indutor causa alterações epigenéticas que refletem no metabolismo do organismo produtor.

Os metabólitos secundários podem ser utilizados basicamente de três formas: uso direto do produto da fermentação e suas frações purificadas; uso como precursor para alterações sintéticas em sua composição e estrutura; ou servir de moldes para a estruturação racional durante a construção de drogas sintéticas (MONCIARDINI et al., 2014).

Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são os grupos mais comuns de bactérias produtoras de metabólitos secundários, com exceção das actinobactérias *Streptomyces*, as quais foram exploradas predominantemente quanto à síntese de antibióticos (BERDY, 2005).

Bactérias do gênero *Bacillus* são exploradas biotecnologicamente na agroindústria devido à produção de metabólitos antimicrobianos utilizados na fabricação e aplicação de fungicidas microbiológicos. Os lipopeptídeos (LP) são metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* através do sistema multienzimático de NRPS (*Non ribosomal peptide synthetases*) ou sistema híbrido de NRPS e PKS (*Poliketide synthetase*). Segundo Ongena e Jacques (2007), os lipopeptídeos são divididos em três famílias de compostos de natureza semelhante:

- os LP da família da surfactina são biosurfactantes poderosos que possuem característica anfipática, o que lhes confere capacidade de danificar a membrana celular ao se associarem à camada lipídica formando poros que permeiam a célula. Contudo sua ação é reduzida pela presença de esteróis na membrana, resultado em baixa fungitoxicidade.

- a família das iturinas tem ação antifúngica pela permeabilização da membrana pela formação de poros condutores de íons que alteram as condições osmóticas da célula.

- enquanto que a terceira família de lipopeptídeos é formada pelas fengicinas, com alta ação fungitóxica, especificamente contra fungos filamentosos, com mecanismos de alteração nas camadas lipídicas da membrana celular, além da imunização sistêmica das plantas hospedeiras por sinalização bioquímica.

Os LP podem agir em sinergia entre si, aumentando sua capacidade de biocontrole (MIHALACHE et al., 2017). As surfactinas, além de possuir efeitos bactericidas,

umentam a eficiência do controle biológico por participarem da formação de biofilmes de *Bacillus subtilis*, condição necessária para colonização da rizosfera. Dessa forma, cepas que são capazes de produzir os três tipos de lipopeptídeos não agem somente em fungos, como também reestruturam a comunidade microbiológica da rizosfera pelas condições de competição (ONGENA; JACQUES, 2007). O maior entrave no uso de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* em escala industrial é o custo de produção para atingir níveis satisfatórios de purificação (COUTTE et al., 2017).

Visto que a bioprospecção é praticada por vários laboratórios de instituições públicas e privadas, a caracterização das moléculas descobertas é essencial para garantir a desreplicação de produtos naturais (BÉRDY, 2005), devido ao fato que moléculas de ocorrência mais abundante são frequentemente reisoladas, como resumido por Monciardini et al. (2014) na frase “Frutos mais baixos são recolhidos primeiro”. Casos mais sérios de isolamento de moléculas anteriormente já catalogadas ocorrem quando nomenclatura errônea é atribuída a compostos tidos como inéditos, situação que causa confundimento na literatura, pode levar tempo para ser esclarecida e acarretar em problemas de patenteamento (BERDY, 2005).

2.2 RISCOS NO USO DE PRODUTOS NATURAIS

Aplicação de fungicidas é desvantajosa no sentido de potencialmente causar a contaminação do solo e do ambiente, resistência a fungicidas e toxicidade a organismos não alvo (NAGARAJKUMAR et al., 2004). Entretanto, a seletividade do alvo separa metabólitos secundários entre compostos de toxicidade específica ou não, ou seja, algumas moléculas produzidas não apresentam alvo definido, portanto se comportam como toxinas a vários organismos. Assim, Deising, Gase e Kubo (2017) alertam para o fato de que algumas micotoxinas mortais são encontradas em produtos vegetais e que suas doses letais necessárias para matar metade das cobaias em testes toxicológicos (DL50) podem ser da ordem de mg kg^{-1} de peso vivo do indivíduo que as ingere.

Os autores compararam as DL de toxinas naturais, fungicidas químicos e substâncias de uso humano comum, como sal de cozinha e álcool, e concluíram que os níveis letais de algumas substâncias legalmente toleradas são substancialmente menores que substâncias proibidas, questionando a racionalidade da legislação. Ressaltam ainda que o risco dos metabólitos secundários produzidos por agente utilizados como controle biológico de doenças de plantas é desconhecido, e agravado pela enorme gama de moléculas produzidas por microrganismos influenciada por fatores bióticos, como a presença de outros organismos e suas

formas de competição, e fatores abióticos como o estresse causado pela aplicação de produtos fitossanitários.

2.3 MICROBIOLOGIA EM CAVERNAS

Os estudos da microbiologia em cavernas se iniciaram abrangendo as transformações químicas nos minerais causadas pelos microorganismos (BARTON E NORTHUP, 2007), e atualmente, envolvem a avaliação de seu potencial biotecnológico como fonte de material para a indústria, farmácia, medicina e agricultura, devido à produção de enzimas, antimicrobianos, metabólitos ativos com efeitos citotóxicos e fitossanitários (KAMBESIS, 2007; LAMPRINO et al., 2015; RIQUELME et al., 2016).

As cavernas podem apresentar biomas semelhantes, porém seu isolamento interno e a combinação entre suas caracterizações físicas, químicas e biológicas tornam cada ambiente cavernícola único, refletindo na diversidade de microorganismos (GHOSH et al., 2017a).

A riqueza e abundância de microorganismos variam dentro de uma mesma caverna devido às diferenças de ambientes ao longo de sua extensão (KLUSAITE et al., 2016). Existem genericamente quatro tipos de ambientes: a entrada, onde ocorre a passagem de ar e luz externos possibilitando o desenvolvimento de plantas; a zona de crepúsculo, onde luz já é limitada, predominando organismos heterotróficos; a zona de transição, onde nenhuma luz é detectada, porém alterações de umidade e temperatura externas ainda influenciam o ambiente interno; e a zona profunda, na qual o fluxo de energia é baixo e a temperatura e umidade se mantêm constantes (GHOSH et al., 2017). Amostras obtidas de diferentes regiões de uma caverna ou de outras cavernas podem apresentar microorganismos de táxons distintos, desde variações menores, a nível de filo, até variações mais específicas, a nível de estirpes (YASIR, 2017).

A diversidade microbiana pode considerar, também, as variações nos clusters gênicos específicos para a produção de metabólitos secundários, como os genes responsáveis pela síntese de policetídeos e peptídeos não ribossomais, já que estirpes selvagens ou não estudadas do ponto de vista metagenômico, mesmo que de espécies já conhecidas, têm chances de possírem rotas metabólicas únicas devido à influência de seu local de origem, como constatado por Charlop-Powers et al. (2015). A diversidade de genes relacionados ao potencial de produzir metabólitos secundários é influenciada pelo bioma e pela distância geográfica dos pontos de coleta. Uma ordem crescente de diversificação foi observada por esses autores entre

biomas semelhantes próximos, biomas distintos, porém próximos e biomas semelhantes separados geograficamente em escala global. Ou seja, mesmo que biomas semelhantes sejam explorados, a probabilidade de bactérias possuírem genes distintos de produção de metabólitos secundários é maior se esses biomas estiverem longe entre si.

Assim, o estudo de novos ambientes é promissor para a descoberta de moléculas microbianas, e o diferencial das cavernas são suas condições adversas para a vida microbiana, como temperaturas extremas, baixa luminosidade, nutrientes escassos e o isolamento do ambiente externo, de forma que microorganismos cavernícolas acabam por ter um metabolismo adaptado para sobrevivência, o que aumenta a expectativa de metabólitos inéditos (AXENOV-GIBANOV et al., 2016; GHOSH et al., 2017b).

Microorganismos que habitam ambientes cavernícolas podem produzir compostos com ação inibitória sobre outros organismos, a fim de favorecer seu desenvolvimento em situações de competição. Dentre os produtos, estão enzimas líticas e antimicrobianos, moléculas extremamente interessantes para a agricultura, pois podem ser utilizadas em programas de controle biológico como alternativa a fungicidas químicos, seja por causa da resistência de fitopatógenos às moléculas atuais ou pela preocupação em diminuir a poluição ambiental e o risco à saúde animal e humana (HAN et al., 2015).

Os produtos de origem cavernícola podem ser as próprias bactérias vivas, uma molécula isolada após processos de extração e fracionamento ou até mesmo moléculas alteradas sinteticamente a partir de um composto natural (MONCIARDINI et al., 2014). Assim, dá-se a importância do estudo do potencial antifúngico de bactérias cavernícolas e seus metabólitos.

2.4 FUNGOS E DOENÇAS DE PLANTAS CULTIVADAS

Doenças que atacam plantas cultivadas são um sério problema para a agricultura, pois podem causar perdas significativas de produção em culturas importantes quando mal manejadas.

O fungo *S. sclerotiorum* é patogênico a 78 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas (BOLAND, 1994), infectando espécies economicamente importantes culturas, como soja, feijão, batata, tomate, ervilha, alface, chicória, repolho, couve-flor, cenoura e outras (PAVAN; KRAUSE-SAKATE; KUROZAWA, 2005). Em feijão, a doença inicia-se em reboleiras na lavoura, por ocasião do florescimento, especialmente nos locais onde há maior crescimento vegetativo e acamamento das plantas. Os sintomas são visíveis nas folhas, hastes e vagens, começando com a formação de manchas encharcadas, seguida por crescimento

micelial branco e cotonoso, que é característico do mofo-branco. Com o progresso da doença, as folhas murcham. Dentro e fora dos tecidos infectados são formadas partículas duras e negras, de formato irregular, facilmente visíveis a olho nu, que são os escleródios do fungo. Os tecidos doentes tornam-se secos, leves e quebradiços, e as sementes infectadas ficam sem brilho, enrugadas e mais leves. (ABREU, 2005)

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich agente causal de podridões de raízes e caules, é um organismo bastante difundido, parasitando mais de 500 espécies de plantas (Sinclair; Backman, 1989) notadamente culturas agronomicamente importantes como alfafa (*Medicago sativa* L.), algodão (*Gossypium* spp.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.), caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), citrus (*Citrus* spp.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), entre outras (SINCLAIR & BACKMAN, 1989).

Os sintomas na parte aérea usualmente se confundem com aqueles da murcha de *Fusarium* e são caracterizados pelo amarelecimento das folhas e murcha da planta, podendo ou não haver escurecimento do caule. Na parte subterrânea, os sintomas são mais característicos, e pode ocorrer necrose parcial ou total da raiz e do colo da planta, com o desprendimento da camada cortical da raiz; com o decorrer do tempo, a podridão evolui da raiz em direção ao caule, tornando-se parcial ou totalmente enegrecida. Nesta fase, é mais fácil distinguir a podridão de *Macrophomina* da murcha de *Fusarium*, uma vez que pode ser observada, na parte interna do caule, a presença de pequenas estruturas negras arredondadas que correspondem aos microescleródios do fungo. O patógeno sobrevive por vários anos no solo e em restos de cultura. (SOARES; COUTINHO; ARAÚJO, 2015).

O gênero *Fusarium* é caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso (Domsch et al., 1980). Muitas espécies causam o apodrecimento de estoques e são importantes produtoras de toxinas (GODOY; COLOMBO, 2004).

No solo, o *Fusarium* pode sobreviver por 10 anos ou mais, sendo um fungo parasita que entra por aberturas causadas por nematoides ou por outros danos nas raízes para alcançar o sistema vascular e se espalhar pelos vasos, bloqueando-os parcialmente e reduzindo o suprimento de água para a planta (PROFIGEN, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antagonista de filtrados de bactérias cavernícolas, produzidos em diferentes tempos, contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar para cada isolado bacteriano qual filtrado de monocultivo, e seu respectivo tempo de fermentação, foi responsável por aumentar a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos cultivados.

Verificar se a atividade das enzimas celulases, amilases, proteases, endoglucanases e pectinases, está correlacionada com o crescimento micelial dos fungos.

Verificar se houve diferenças de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos cultivados, após tratamento com filtrados de bactérias cavernícolas preparados em cocultivo com os respectivos fungos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS CAVERNÍCOLAS

Bactérias isoladas de paredes e guanos de cavernas do município de Altamira-PA, gentilmente cedidas pela Universidade Federal do Pará, foram testadas por Almeida et al. (2016) quanto a seu potencial de inibir o crescimento micelial de *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*. As bactérias que compuseram o grupo com maior porcentagem média de inibição do crescimento micelial pela técnica de cultivo pareado foram selecionadas para produção dos filtrados testados nesse trabalho, sendo elas os isolados identificados como BAC 10, BAC 13, BAC 14, BAC 19, BAC 22, BAC 26, BAC 29, BAC 33, BAC 36 e BAC 49.

4.2 PARTE I – FILTRADOS DE MONOCULTIVO BACTERIANO

4.2.1 Cultivo contínuo e curva de crescimento

As bactérias foram semeadas em meio de cultura Triptona-Soja-Ágar (TSA) e incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C por 24 horas. Após constatado o crescimento, células foram colhidas por raspagem de 5 mm superfície da placa com auxílio de alça de platina. O inóculo de cada isolado foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 100 mL de caldo nutriente, totalizando 44 frascos, sendo 4 frascos para cada isolado e 4 brancos (Figura 4.1).



Figura 4.1 – Colônias de bactérias cavernícolas crescidas em meio TSA.

Os isolados foram agrupados e identificados de acordo com o tempo de cultivo ao qual foram submetidos: 10, 20, 30 ou 40 horas de cultivo contínuo, teoricamente correspondentes às fases de crescimento lag, exponencial, estacionária e declínio, respectivamente (Figura 4.2).



Figura 4.2 – Frascos Erlenmeyer contendo de caldo nutriente para cultivo líquido de bactérias.

O cultivo contínuo ocorreu em mesa agitadora ajustada para 170,5 RPM, em temperatura e luminosidade ambientes (Figura 4.3). Ao fim de cada período de cultivo, alíquotas de 1 mL dos caldos foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da absorbância no comprimento de onda 582 nm (Figura 4.4). A calibração do aparelho foi realizada com o branco respectivo de cada tempo de cultivo, seguido da leitura dos caldos. A leitura foi repetida três vezes, estabelecendo uma curva de crescimento bacteriano caracterizado pela absorbância dos caldos em função do tempo de cultivo.



Figura 4.3 – Mesa agitadora horizontal para cultivo contínuo.



Figura 4.4 – Turbidez do caldo nutriente após período de 10 horas de cultivo contínuo de bactérias, ‘BAC 10’ à esquerda e ‘Branco’ à direita.

4.2.2 Produção dos filtrados

Ao fim dos períodos de cultivo, os caldos foram mantidos congelados em freezer a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a seu processamento, constituído pela centrifugação a 4000 RPM (2146 FCR – força centrífuga relativa) por 20 minutos a fim de precipitar as células bacterianas, e esterilização do sobrenadante por filtração em filtro de teflon com malha de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Figura 4.5). Os filtrados foram, então, conservados congelados para a realização dos experimentos.



Figura 4.5 – Filtração do sobrenadante de caldo nutriente após o cultivo contínuo de bactérias.

4.2.3 Produção de inóculo de fungos fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos utilizados foram *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* isolados de soja e dois isolados de *Fusarium solani* obtidos de raízes de mandioca, identificados como F1 e F2, a partir de diferenças morfológicas e microscópicas (AZEVEDO, 2017).

Os fungos foram repicados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) a partir de discos de micélio com 8 mm de diâmetro colocados virados para baixo ao centro das placas de Petri. Os fungos foram incubados em estufa do tipo BOD a 28 °C até que o micélio atingisse a borda da placa.

4.2.4 Experimento I - Difusão em ágar Mueller-Hinton

Os filtrados bacterianos foram descongelados, homogeneizados, e aliquotados com auxílio de micropipeta automática em discos de papel filtro esterilizados, com diâmetro de 7 mm. Foram utilizados 40 µL de filtrado para cada disco de papel, divididos em duas aplicações de 20 µL cada, com intervalo de tempo suficiente para que o disco embebido secasse para suportar nova aplicação (Figura 4.6). Ao final deste procedimento, foram preparados 4 discos por filtrado (repetições).

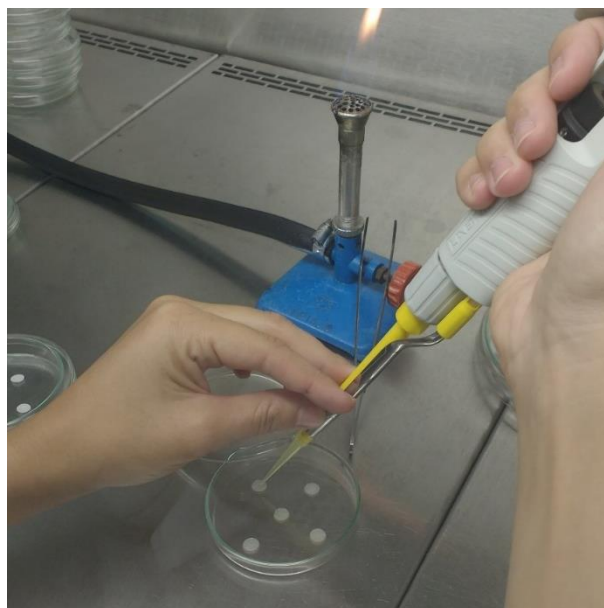


Figura 4.6 – Aplicação de filtrado bacteriano em disco de papel para ensaio de difusão.

Os discos foram transferidos para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura Mueller-Hinton esterilizado (Acumedia, Neogen), as quais foram divididas em quatro quadrantes por duas linhas perpendiculares. Cada quadrante recebeu um disco de papel, disposto a 10 mm da borda da placa. Em seguida, discos de micélio, com 8 mm de diâmetro, foram coletados da região intermediária entre o centro e a borda das placas de Petri preparadas como inóculo. Cada placa com Mueller-Hinton recebeu um disco de micélio voltado para baixo e ao centro (Figura 4.7).

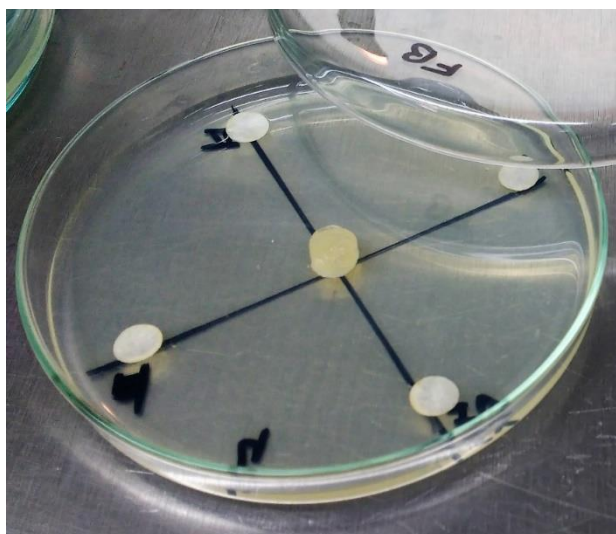


Figura 4.7 – Disco de micélio de *Fusarium solani* rodeado de discos de papel filtro embebidos em filtrado bacteriano.

4.2.5 Experimento II - Inibição em BDA

Placas contendo meio de cultura (batata-ágar-dextrose) BDA receberam 100 μ L de filtrado, os quais foram espalhados com auxílio de alça de Drigalski até secarem (Figura 4.8). Em seguida, discos de micélio foram inoculados ao centro da placa. O preparo de inóculo, a inoculação e o cultivo dos fungos seguiram os mesmos protocolos descritos anteriormente.

4.3 PARTE II - FILTRADOS DE COCULTIVO BACTERIANO E FÚNGICO

4.3.1 Inoculação das bactérias

As bactérias foram repicadas em meio de cultura Triptona-Soja-Ágar e

incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C por 24 horas. Após constatado o crescimento, com células foram raspadas de 5 mm da superfície da placa com auxílio de alça de platina, e um inóculo de cada isolado foi transferido para microtubos de 1500 µL contendo 1000 µL de solução de NaCl 0,85% (m/v) esterilizada. Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização. Foram retiradas alíquotas de 300 µL da suspensão bacteriana e transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de caldo nutriente esterilizado. Foram preparados 3 frascos para cada isolado bacteriano, os quais foram posteriormente divididos para o cultivo de bactérias, bactérias+fungo morto e bactérias+fungo vivo, para cada um dos fitopatógenos estudados.

4.3.2 Inoculação dos fungos

Discos de micélio foram retirados de colônia de *F. solani* F2 crescida em BDA, conforme metodologia de preparo de inóculo descrita anteriormente. Os discos de micélio morto foram preparados a partir da autoclavagem do inóculo em frascos de vidro, a 121 °C por 30 minutos (Figura 4.8).

Discos de micélio vivo e morto foram transferidos para os respectivos frascos afim de serem incubados para cultivo. O cultivo contínuo ocorreu em mesa agitadora ajustada para 170,5 RPM, em temperatura e luminosidade ambientes durante 40 horas. Ao fim do período de cultivo, alíquotas de 1 mL dos caldos apenas com bactérias foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da absorbância no comprimento de onda 582 nm. A calibração do aparelho foi realizada com o branco, seguido da leitura dos caldos. A leitura foi repetida três vezes.

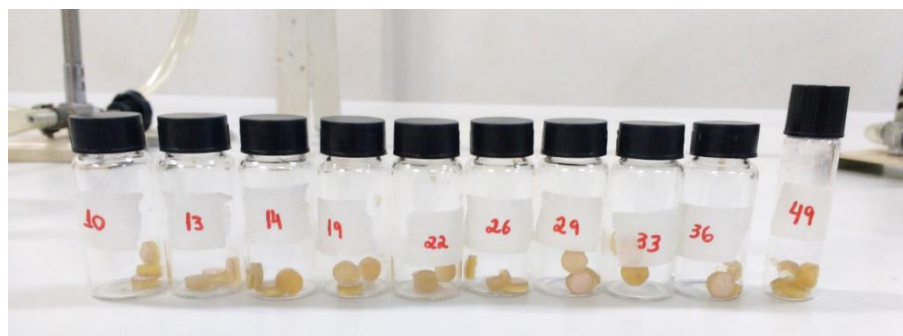


Figura 4.8 – Discos de micélio em frascos de vidro para serem autoclavados.

4.3.3 Produção dos filtrados

Ao fim dos períodos de cultivo, os caldos foram mantidos congelados em freezer a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a seu processamento, constituído pela centrifugação a 4000 RPM por 30 minutos a fim de precipitar as células bacterianas e fúngicas, e esterilização do sobrenadante com uso de filtro de teflon com malha de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Figura 4.11). Os filtrados foram, então, identificados e conservados congelados para a realização dos experimentos.

4.3.4 Experimento III - Difusão em ágar Mueller-Hinton

Placas contendo meio de cultura BDA receberam $100\text{ }\mu\text{L}$ de filtrado de cocultivo, os quais foram espalhados com auxílio de alça de Drigalski até secarem. Em seguida, discos de micélio foram inoculados ao centro da placa. O preparo de inóculo, a inoculação e o cultivo dos fungos seguiram os mesmos protocolos descritos anteriormente.

4.4 PARTE III – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FILTRADOS BACTERIANOS

A atividade enzimática dos filtrados bacterianos foi avaliada pela disposição de discos de papel de 7 mm de diâmetro embebidos com $100\text{ }\mu\text{L}$ de filtrado sobre meios de cultura específicos para cada enzima. Foram utilizados 5 discos (repetições) por placa, incubados em estufa BOD a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 36 horas, com exceção dos meios para atividade endoglucanólítica e pectinolítica, as quais foram incubadas por 48 horas.

Os meios de cultura utilizados foram (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975):

- meio para atividade amilolítica: caldo nutriente (de acordo com o fabricante), 2 g de amido solúvel, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O meio teve pH ajustado para 6,0 com gotas de NaOH 1 M. e foi autoclavado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. A revelação do meio de cultura foi realizada pela cobertura das placas com solução de lugol 12,5% da solução concentrada. A atividade amilolítica foi observada pela presença de halos de degradação claros ao redor dos discos.

- meio para atividade proteolítica: 10 g de glicose, 5 g de leite em pó desnatado, 1,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de NaCl, 0,01 g FeSO_4 , 0,01 g de ZnSO_4 , 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O meio teve pH ajustado para 6,8-7,0 com

gotas de NaOH 1 M e foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. A atividade proteolítica foi observada pela presença de halos de degradação transparentes ao redor dos discos.

- meio para atividade celulolítica: 5 g de carboximetil celulose, 1 g de NH_4NO_3 , 50 mL de solução NaCl a 0,85% (m/v), 15 g de ágar e 950 mL de água destilada. O meio teve pH ajustado para 6,5-7,0 com gotas de NaOH 1 M e foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. A revelação do meio de cultura foi realizada pela cobertura das placas com solução de vermelho congo a 0,1% (m/v) por 15 minutos, seguida do enxague por 1 minuto com solução de NaCl a 1 M. A atividade celulolítica foi observada pela presença de halos de degradação alaranjados ao redor dos discos.

- meio para atividade endoglucanólítica: 5 g de NaCl, 0,4 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KNO_3 , 0,1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de extrato de levedura, 1 g de carboximetil celulose, 14 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O meio teve pH ajustado para 6,8-7,0 com gotas de NaOH 1M e foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. A revelação do meio de cultura foi realizada pela cobertura das placas com solução de brometo de cetiltrimetil amônio por uma hora a 4°C. A atividade endoglucanólítica foi observada pela presença de halos de degradação claros aos redor dos discos.

- meio para atividade pectinolítica: solução 1, contendo 0,2 g de KH_2PO_4 e 0,36 g de K_2HPO_4 e 200 mL de água destilada; solução 2, contendo 5 g de pectina e 200 mL de água destilada; solução 3, contendo 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,001 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g de CaCl_2 , 1 g de extrato de levedura, 15 g de ágar e 600 mL de água destilada. O pH das soluções foi ajustado para 6,8-7,0 com gotas de NaOH 1 M, e autoclavadas separadamente a 121 °C por 20 minutos. A revelação do meio de cultura foi realizada pela cobertura das placas com solução de brometo de cetiltrimetil amônio por uma hora, seguida do enxágue com água destilada esterilizada. A atividade pectinolítica foi observada pela presença de halos de degradação claros ao redor dos discos.

4.5 AVALIAÇÕES

4.5.1 Diâmetro de colônia

O crescimento radial do micélio foi medido com auxílio de régua milimetrada e convertido em diâmetro de colônia, em milímetros, ao final do experimento.

4.5.2 Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC)

Foram utilizados os valores de diâmetro de colônias fúngicas obtidas ao fim do experimento para calcular a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), conforme a fórmula descrita por Silva (2011):

$$PIC(\%) = \frac{(C - T)}{C} \times 100,$$

sendo:

C = Diâmetro do crescimento micelial da colônia controle;

T = diâmetro do crescimento micelial do tratamento.

4.5.3 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

O crescimento diário do micélio foi medido com auxílio de régua milimetrada, e os valores foram utilizados na fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$IVCM (mm \text{ dia}^{-1}) = \frac{\sum D - Da}{N}$$

sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial ($mm \text{ dia}^{-1}$);

D = diâmetro médio atual da colônia (mm);

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior (mm);

N = número de dias após a inoculação

A última avaliação ocorreu quando o micélio da testemunha atingiu a borda da placa de Petri.

4.5.4 Atividade enzimática

Os diâmetros dos halos de degradação de cada enzima foram medidos com auxílio de régua milimetrada ao fim do período de incubação e devida revelação.

4.5.5 Análises estatísticas

Os experimentos de difusão em ágar Muller-Hinton e inibição em BDA foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos o tempo de cultivo e uma testemunha, com 4 repetições.

Antes de submeter os dados à análise de variância, foi realizada a análise de resíduos para verificar a adequação dos modelos às pressuposições da ANOVA. Foram utilizados o teste de Shapiro-Wilk para normalidade, o teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) e o teste de Durbin-Watson para independência dos erros, considerando 5% de nível de significância, com auxílio dos pacotes *easyanova* e *car* do *software R*.

Os dados de diâmetro médio das colônias fúngicas foram analisados pela ANOVA e teste de Scott-Knott a 5% de significância para agrupamento de médias. Os valores de de porcentagem de inibição do crescimento micelial foram indicados em frente às médias dos diâmetros correspondentes.

A relação entre a atividade enzimática dos filtrados de monocultivo e o IVCN dos fungos foi analisada por técnica de correlação. Por sua vez, a relação entre a atividade enzimática dos filtrados de cocultivo e o IVCN de seus respectivos fungos foi analisada por meio de Análise de Componentes Principais (ACP), com a finalidade de preservar os efeitos individuais que os fungos mortos ou vivos causaram nos filtrados bacterianos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6 CURVAS DE CRESCIMENTO

O cultivo bacteriano causa o aparecimento de turbidez em meio líquido, pois o acúmulo de células reduz a passagem da luz pelo caldo, elevando sua absorbância. Foram observados comportamentos semelhantes das curvas de crescimento para todas as bactérias, com aumento rápido de absorbância a partir das 10 horas, seguido de uma estabilização no crescimento a partir de 20 horas, atingindo-se a fase estacionária (Figura 5.1). É nessa fase que os nutrientes do meio de cultura começam a se tornar limitados, devido ao grande número de células em competição, potencialmente ativando vias de metabolismos secundário, que são mais facilmente expressas durante situações adversas.

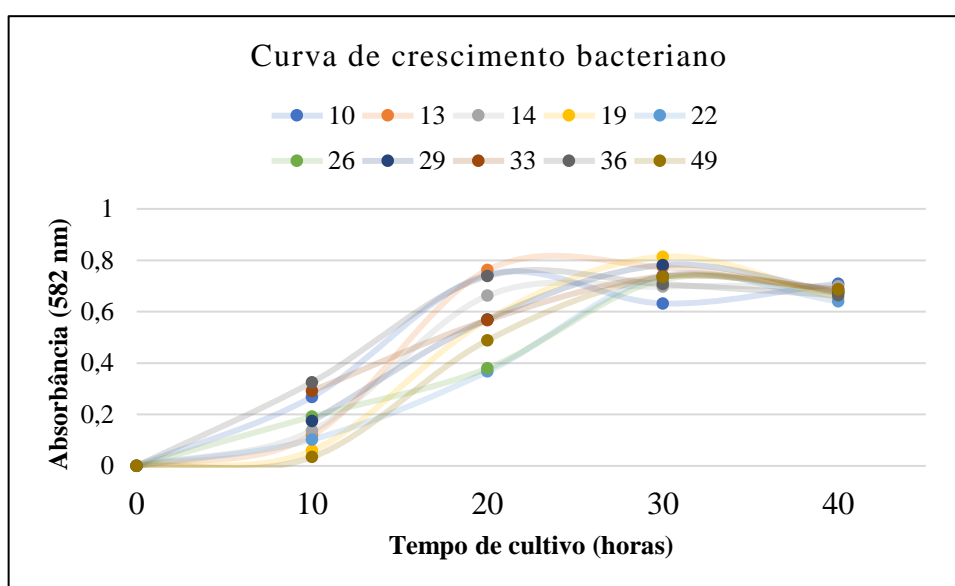


Figura 5.1 – Curva de crescimento de bactérias cavernícolas (absorbância – 582 nm) em caldo nutriente em função do tempo de cultivo (horas).

A atividade antifúngica de filtrados de *Bacillus velezensis* G341 amostrados ao longo do período de cultivo foi significativamente correlacionada com o crescimento das células, em experimento conduzido para avaliar a inibição de *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em arroz. A inibição do crescimento micelial foi perceptível em filtrados crescidos pouco antes de 40 horas de cultivo, e o tempo ótimo para a produção de metabólitos bioativos contra *M. oryzae* foi de aproximadamente 96 horas, sendo isolados e identificados os lipoptídeos fengicina A e bacilomicina L (família das iturinas) nesse filtrado. (LIM et al., 2017).

A produção *in vitro* de surfactinas por *Bacillus* ocorre na transição da fase de crescimento exponencial para estacionária, seguida do acúmulo de fengicinas, no início da fase estacionária, e iturinas, mais tardiamente (ONGENA; JACQUES 2007). Ambrico e Trupo (2017) observaram a produção de iturina A em filtrados de *Bacillus subtilis* ET-1 ao final da fase exponencial, com acúmulo máximo no tempo de 57 horas.

Mudanças de turbidez ao longo dos períodos de cultivo podem ter ocorrido devido às variações de temperaturas máximas e mínimas, uma vez que o período de 10 e 30 horas ocorreram durante o dia e os períodos de 20 e 40 horas ocorreram durante a noite (Figura 5.2).

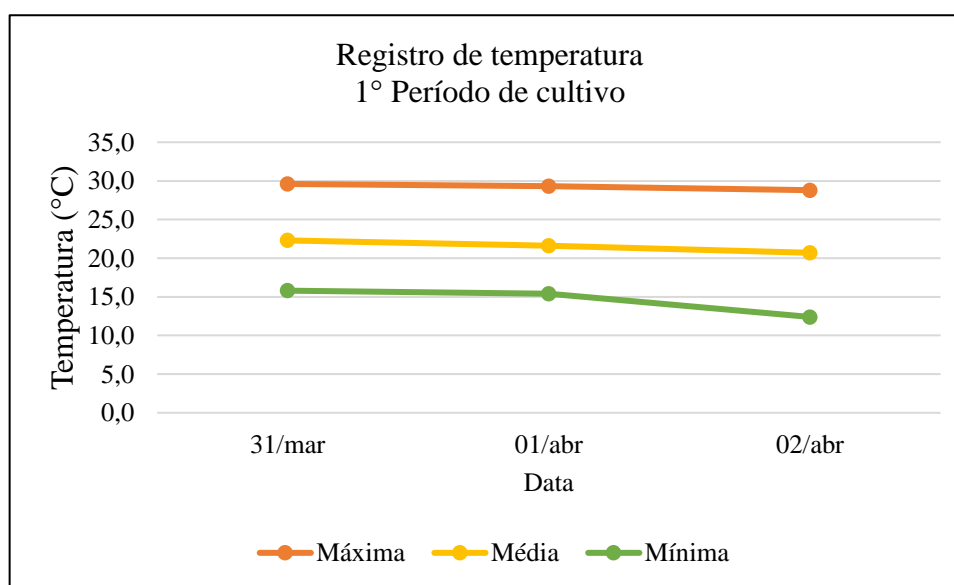


Figura 5.2 – Registro de temperaturas máximas, médias e mínimas durante o primeiro período de cultivo.

4.7 PARTE I – FILTRADOS DE MONOCULTIVO BACTERIANO

4.7.1 Difusão em Ágar Mueller-Hinton

4.7.1.1 *Fusarium solani* F1 em Mueller-Hinton

Foi observado um diâmetro de 82,50 mm nas colônias de *Fusarium solani* F1 no tratamento testemunha. Os tempos de 20, 30 e 40 horas de cultivo da ‘BAC 10’ reduziram o crescimento micelial, resultado em colônias com médias de 75,50, 72,50 e 76,00 mm de

diâmetro, correspondentes a 8,48%, 12,12% e 7,88% de PIC, respectivamente (Tabela 5.1). A redução do crescimento fúngico a partir de 20 horas de cultivo também foi constatada para os filtrados de ‘BAC 29’ e ‘BAC 36’, com inibições de 11,82% a 15,76% e 9,39% a 12,73%, respectivamente.

Foi observada a redução do crescimento micelial com uso dos filtrados de ‘BAC 19’ e ‘BAC 33’ no tempo de cultivo de 20 horas. Tais tratamentos apresentaram os maiores valores de PIC, com médias de 16,97% e 18,18% para ‘BAC 19’ e ‘BAC 33’, respectivamente. O aumento no tempo de cultivo não correspondeu a maior inibição, visto que o diâmetro das colônias fúngicas volta a aumentar após 30 horas de cultivo.

O tempo de 30 horas correspondeu ao mínimo crescimento de *F. solani* F1 para os filtrados de ‘BAC 26’, com colônia de 67,50 mm de diâmetro e inibição máxima de 18,18%. Contrário a esse efeito, os maiores valores de inibição nos tratamentos com uso dos filtrados de ‘BAC 14’, ‘BAC 22’ e ‘BAC 49’ cultivados por 40 horas, os quais reduziram o crescimento micelial em 20,00%, 18,79% e 20,30%, respectivamente.

Tabela 5.1 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias, em milímetros, de *Fusarium solani* F1 cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	82,50 a	-	82,50 b	-	82,52 a	-	82,50 a	-	82,50 a	-
10 horas	79,25 a	3,94	87,75 a	0,00	72,50 c	12,12	78,25 b	5,15	81,25 a	1,82
20 horas	75,50 b	8,48	74,75 c	9,40	75,25 b	8,79	68,50 c	16,97	74,25 b	10,00
30 horas	72,50 b	12,12	73,25 c	11,21	75,75 b	8,19	75,50 b	8,49	73,75 b	10,61
40 horas	76,00 b	7,88	68,25 d	17,27	66,00 d	20,00	71,25 b	13,63	67,00 c	18,79
CV (%)	4,61		3,41		3,39		2,96		3,07	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	82,50 a	-	82,50 a	-	82,50 a	-	82,50 a	-	82,50 a	-
10 horas	85,50 a	0,00	84,75 a	1,36	85,00 a	0,00	83,00 a	0,76	88,25 a	0,15
20 horas	77,25 b	6,36	69,50 b	15,76	67,50 c	18,18	74,00 b	10,30	75,75 b	8,18
30 horas	67,50 d	18,18	72,75 b	11,82	71,00 b	13,94	72,00 b	12,73	73,00 b	11,51
40 horas	72,75 c	11,82	69,50 b	15,76	74,25 b	10,00	74,75 b	9,39	65,75 c	20,30
CV (%)	4,16		5,15		3,05		3,20		5,29	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Em uma visão geral, efeitos desejados de maior redução do crescimento micelial de *F. solani* F1 foram detectados após o tempo mínimo de 20 horas para a produção dos filtrados bacterianos testados.

4.7.1.2 *Fusarium solani* F2 em Mueller-Hinton

O tempo de cultivo de 10 horas foi suficiente para permitir ao filtrado de ‘BAC 10’ reduzir o diâmetro das colônias de *Fusarium solani* F2 de 76,25 mm para 63,25 mm, resultando em 17,05% de PIC, a qual foi a maior porcentagem de inibição entre os tratamentos testados contra esse fungo. Valores de 12,13% e 11,48% de PIC foram observados nos tratamentos com ‘BAC 33’ e ‘BAC 22’, respectivamente, ambos com tempo de cultivo de 30 horas (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Fusarium solani* F2 cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	76,25 a	-	76,25 b	-	76,25 b	-	76,25 c	-	76,25 c	-
10 horas	63,25 b	17,05	82,25 a	0,00	86,25 a	0,00	85,75 b	0,00	85,00 a	0,00
20 horas	75,25 a	1,56	81,25 a	0,00	80,50 a	0,08	73,25 d	3,93	70,25 d	7,87
30 horas	76,75 a	1,15	74,25 b	2,62	81,50 b	0,41	89,00 a	0,00	67,50 e	11,48
40 horas	77,00 a	0,16	70,25 c	7,87	84,50 b	0,00	79,00 c	0,08	80,50 b	0,00
CV (%)	3,52		2,42		4,26		2,53		2,08	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	76,25 b	-	76,25 b	-	76,25 b	-	76,25 b	-	76,25 b	-
10 horas	85,75 a	0,00	72,00 c	5,57	87,50 a	0,00	87,00 a	0,00	80,25 a	0,00
20 horas	80,50 b	0,08	70,50 c	7,54	80,50 a	0,74	71,50 c	6,23	75,50 b	1,48
30 horas	76,00 b	1,23	83,75 a	0,00	67,00 c	12,13	87,25 a	0,00	82,25 a	0,00
40 horas	78,00 b	0,08	75,25 b	1,56	83,75 a	0,00	85,25 a	0,00	81,00 a	0,00
CV (%)	4,15		2,63		4,78		2,68		3,05	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Os filtrados de ‘BAC 19’, ‘BAC 29’ e ‘BAC 36’ no tempo de 20 horas foram capazes de reduzir o diâmetro das colônias para 73,25 mm, 70,50 mm e 71,50 mm, respectivamente, porém esses valores correspondem a porcentagens de inibições baixas, com médias de 3,93%, 7,54% e 6,23%. Resultados de menor inibição também foram observados

com uso do filtrado de ‘BAC 13’, o qual reduzir o crescimento da colônia fúngica apenas em 7,87%, quando produzido no tempo de 40 horas.

O isolado F2 de *Fusarium solani* se mostrou menos sensível aos filtrados dos isolados ‘BAC 14’, ‘BAC 26’ e ‘BAC 49’, uma vez não houve redução do diâmetro das colônias após a aplicação destes tratamentos.

4.7.1.3 *Macrophomina phaseolina* em Mueller-Hinton

O fitopatógeno *M. phaseolina* se apresentou menos sensível aos filtrados dos isolados testados, sendo que o filtrado da ‘BAC29’ com 40 horas de cultivo reduziu significativamente o diâmetro das colônias de 60,50 mm para 51,00 mm, resultando em 15,70% de PIC (Tabela 5.3).

Os filtrados das demais bactérias estimularam o crescimento fúngico ou não alteraram o diâmetro das colônias, mesmo os menores valores observados não foram significativamente diferentes da média da testemunha.

Tabela 5.3 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Macrophomina phaseolina* cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	60,50 b	-	60,50 b	-	60,50 b	-	60,50 c	-	60,50 c	-
10 horas	69,00 a	0,00	74,50 a	0,00	74,58 a	0,00	73,00 b	0,00	64,50 b	0,00
20 horas	53,25 b	11,98	61,50 b	2,48	67,50 a	0,00	81,00 a	0,00	65,50 b	0,00
30 horas	68,75 a	0,21	75,50 a	0,00	64,33 b	2,69	81,00 a	0,00	85,25 a	0,00
40 horas	71,25 a	0,00	74,25 a	0,00	69,50 a	0,00	64,50 c	0,00	55,75 c	7,85
CV (%)	8,46		6,80		7,32		5,53		5,11	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	60,50 c	-	60,50 b	-	60,50 c	-	60,50 b	-	60,50 b	-
10 horas	83,75 a	0,00	80,75 a	0,00	71,50 b	0,00	82,25 a	0,00	80,00 a	0,00
20 horas	61,25 c	1,24	65,25 b	0,00	77,25 a	0,00	66,25 b	0,00	80,00 a	0,00
30 horas	58,00 c	4,34	60,00 b	3,72	57,00 c	6,40	64,50 b	0,21	63,00 b	1,03
40 horas	68,00 b	0,00	51,00 c	15,70	77,75 a	0,00	66,75 b	0,00	66,75 b	1,45
CV (%)	4,06		6,38		5,33		5,26		6,03	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

4.7.1.4 *Sclerotinia sclerotiorum* em Mueller-Hinton

O tempo de 10 horas foi suficiente para os filtrados das ‘BAC 13’ e ‘BAC 19’ reduzirem o diâmetro das colônias de *S. sclerotiorum* de 71,75 mm para 64,00 mm e 54,50 mm, respectivamente, correspondentes a 10,80% e 24,04% de inibição. O tempo mínimo de cultivo testado também demonstrou efeito de redução do crescimento micelial para os filtrados de ‘BAC 22’, porém esse isolado apresentou mais de um momento de inibição, dado também pelo tempo de 30 horas, com médias de 25,44% e 22,30%, respectivamente (Tabela 5.4). Esses resultados podem ser explicados por variações de temperatura entre os períodos de cultivo, uma vez que os tempos de 20 e 40 horas ocorreram parcialmente em períodos noturnos.

Os maiores valores de inibição foram observados no tempo de 20 horas para o isolado ‘BAC 26’ (27,18%), no tempo de 30 horas para os isolados ‘BAC 10’ (32,40%), ‘BAC 29’ (19,86%) e no tempo de 40 horas para os isolados ‘BAC 36’ (30,31%) e ‘BAC 49’ (14,28%). Esses resultados demonstram que o potencial inibidor dos filtrados é dependente da interação entre o tempo de cultivo e o isolado utilizado.

Tabela 5.4 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	71,75 a	-	71,75 b	-	71,75 b	-	71,75 b	-	71,75 b	-
10 horas	69,75 a	4,36	64,00 c	10,80	72,75 b	1,31	54,50 d	24,04	53,50 c	25,44
20 horas	65,00 a	9,84	70,75 b	2,26	67,00 b	7,40	79,75 a	0,00	77,25 a	0,00
30 horas	48,50 b	32,40	73,00 b	1,31	78,00 a	0,00	68,50 b	5,31	55,75 c	22,30
40 horas	75,50 a	0,00	77,75 a	0,00	78,75 a	0,00	63,25 c	11,85	71,75 b	1,92
CV (%)	6,71		4,98		4,89		6,78		5,01	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	71,75 a	-	71,75 b	-	71,75 b	-	71,75 b	-	71,75 a	-
10 horas	71,75 a	2,70	69,50 b	5,75	85,75 a	0,00	82,25 a	0,00	76,50 a	0,00
20 horas	52,25 c	27,18	80,00 a	0,00	82,00 a	0,00	77,50 b	0,00	74,00 a	0,00
30 horas	74,25 a	0,00	57,50 c	19,86	77,50 a	0,00	75,50 b	0,61	64,00 b	10,80
40 horas	62,00 b	13,59	70,50 b	2,52	65,50 b	9,50	50,00 c	30,31	61,50 b	14,28
CV (%)	6,86		6,44		5,58		5,50		4,05	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Não foram observadas reduções significativas no tamanho das colônias de *S. sclerotiorum* entre a testemunhas e os tratamentos com aplicação dos filtrados de ‘BAC 14’, ‘BAC 33’.

4.7.2 Inibição em BDA

4.7.2.1 *Fusarium solani* F1 em BDA

Apenas os filtrados produzidos com o isolado ‘BAC 49’ não foram capazes de reduzir o crescimento micelial de *Fusarium solani* F1, com valores de diâmetro variando de 80,50 mm a 81,50 mm, os quais não diferiram estatisticamente da testemunha, cuja colônia apresentou 83,75 mm de diâmetro (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Fusarium solani* F1 cultivado em meio BDA com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 a	-
10 horas	75,50 b	9,85	81,50 a	2,69	76,25 b	8,96	81,00 a	3,35	74,00 b	11,64
20 horas	84,00 a	0,52	81,25 a	2,98	77,50 b	7,46	65,00 b	22,39	72,25 b	13,73
30 horas	78,50 b	6,26	68,25 c	18,51	77,75 b	7,16	77,50 a	7,46	72,00 b	14,03
40 horas	72,00 b	14,03	73,25 b	12,54	81,75 a	2,54	82,75 a	1,94	46,75 c	44,18
CV (%)	4,23		2,62		3,62		4,30		4,63	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 a	-
10 horas	72,00 b	14,03	70,50 b	15,82	82,00 a	2,46	57,25 d	31,64	81,25 a	3,95
20 horas	80,00 a	4,55	81,00 a	3,28	78,50 b	6,27	77,25 b	7,76	80,50 a	4,25
30 horas	69,25 b	17,31	67,25 b	19,70	79,00 b	5,67	67,75 c	19,10	80,75 a	3,95
40 horas	66,50 b	20,60	60,75 c	27,46	71,00 c	15,22	81,50 a	2,68	81,50 a	3,35
CV (%)	5,84		5,09		2,81		4,55		4,06	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Os filtrados dos isolados ‘BAC 10’ e ‘BAC 26’ no tempo de 20 horas não foram eficientes em inibir o crescimento fúngico, ao contrário dos demais tempos, os quais resultaram em valores de 6,26 % a 14,03 % e 14,03% a 20,60%, respectivamente. No caso do isolado ‘BAC 14’, apenas o tempo de 40 horas não reduziu o diâmetro da colônia fúngica,

enquanto os demais tempos de cultivo resultaram em porcentagens médias de inibição de 7,16 a 8,96 %.

Os maiores valores de inibição foram observados no tempo de 10 horas para o isolado ‘BAC 36’ (31,64%), no tempo de 20 horas para o isolado ‘BAC 19’ (22,39%), no tempo de 30 horas para o isolado ‘BAC 13’ (18,51%) e no tempo de 40 horas para os isolados ‘BAC 22’ (44,18%), ‘BAC 29’ (27,46%) e ‘BAC 33’ (15,22%).

4.7.2.2 *Fusarium solani* F2 em BDA

O isolado F2 de *Fusarium solani* foi menos sensível aos filtrados testados, visto que apenas três isolados foram capazes de reduzir o tamanho das colônias fúngicas cultivadas em BDA. O tratamento com tempo de cultivo de 30 horas para o isolado ‘BAC 10’ reduziu o diâmetro das colônias de 90,00 mm para 73,50 mm, resultado em 18,33% de PIC (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Fusarium solani* F2 cultivado em meio BDA com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	90,00 a	-	90,00 a	-	90,00 a	-	90,00 a	-	90,00 a	-
10 horas	90,00 a	1,67	87,75 a	2,78	88,50 a	3,33	90,25 a	1,39	89,50 a	1,67
20 horas	87,75 a	2,50	83,00 a	7,78	90,00 a	1,11	88,00 a	2,78	86,75 a	3,61
30 horas	73,50 b	18,33	86,50 a	3,89	86,00 a	5,27	86,75 a	4,17	88,25 a	2,22
40 horas	88,25 a	2,78	86,50 a	3,88	84,00 a	6,67	88,00 a	2,22	85,25 a	5,28
CV (%)	3,86		2,93		4,42		4,43		3,59	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	90,00 a	-	90,00 a	-	90,00 a	-	90,00 a	-	90,00 a	-
10 horas	86,25 a	5,56	88,00 a	2,50	82,50 a	8,33	84,00 b	8,33	83,65 b	7,06
20 horas	83,50 a	7,22	89,25 a	1,39	85,25 a	5,28	83,75 b	6,94	80,75 b	10,28
30 horas	87,50 a	3,05	86,50 a	3,89	85,50 a	5,00	86,85 b	3,50	84,25 b	6,39
40 horas	89,50 a	1,11	88,50 a	2,22	87,50 a	4,17	91,50 a	0,28	90,25 a	0,83
CV (%)	4,46		2,46		4,68		4,56		4,29	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Por outro lado, os tempos de cultivo de 10 a 30 horas para os isolados ‘BAC 36’ e ‘BAC 49’ resultaram em filtrados com potencial inibidor de 3,50 % a 8,33 % e 6,39 % a

10,28 %, respectivamente.

Os filtrados produzidos a partir dos isolados ‘BAC 13’, ‘BAC 14’, ‘BAC 19’, ‘BAC 22’, ‘BAC 26’, ‘BAC 29’ e ‘BAC 33’ não foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. solani* F2.

4.7.2.3 *Macrophomina phaseolina* em BDA

Curiosamente, os resultados de redução do crescimento micelial de *M. phaseolina* em BDA não foram significativos (Tabela 5.7). É possível que o meio de cultura rico em amido e dextrose tenha proporcionado um crescimento fúngico extremamente rápido a ponto de mascarar o efeito dos filtrados, pois em meio de cultura Muller-Hinton foi constatada a presença de moléculas com características antagonistas no filtrados testados.

Tabela 5.7 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Macrophomina phaseolina* cultivado em meio BDA com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	90,50 a	-	90,50 a	-	90,50 a	-	90,50 a	-	90,50 a	-
10 horas	86,50 a	4,42	89,50 a	2,49	92,75 a	0,28	90,25 a	1,66	87,50 a	3,31
20 horas	89,25 a	1,66	90,00 a	2,35	90,75 a	1,93	90,00 a	2,35	89,00 a	2,07
30 horas	89,75 a	1,66	92,75 a	2,21	87,25 a	3,73	86,75 a	5,39	91,00 a	1,38
40 horas	88,25 a	3,73	87,25 a	3,59	90,00 a	1,93	89,75 a	1,93	89,00 a	1,80
CV (%)	3,90		5,50		4,14		5,03		3,14	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	90,50 a	-	90,50 a	-	90,50 a	-	90,50 a	-	90,50 a	-
10 horas	88,50 a	2,76	92,25 a	0,14	90,75 a	0,82	81,25 a	0,28	89,75 a	1,93
20 horas	93,25 a	0,14	89,75 a	1,80	85,00 a	6,08	88,00 a	2,76	90,00 a	1,66
30 horas	88,25 a	3,31	91,25 a	2,21	88,75 a	2,62	89,00 a	3,31	89,75 a	0,97
40 horas	89,75 a	2,07	89,50 a	1,24	87,50 a	3,31	87,75 a	3,04	89,25 a	2,07
CV (%)	4,24		3,97		3,16		3,57		3,44	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

É importante a comparação dos resultados nos dois meios de cultura, pois são metodologias diferentes que podem ser mais adequadas ou sensíveis para indicar a produção de metabólitos bioativos. O meio de cultura Mueller-Hinton é utilizado em testes de sensibilidade

a substâncias por permitir a passagem das moléculas pela malha formada de ágar polimerizado, criando um gradiente de difusão a partir do local que recebeu a aplicação do tratamento.

Em contraste, o meio batata-dextrose-ágar é um meio de cultura amplamente utilizado para o cultivo de fungos em geral, por ser rico em carboidratos, o que permite uma colonização eficiente da superfície da placa pelo patógeno. Como os filtrados testados em BDA foram espalhados com auxílio de alça, é necessário considerar o potencial efeito dos metabólitos secundários na colônia como um todo, tanto em crescimento micelial radial e aéreo quanto na morfologia das hifas e produção de esporos.

Os fungos *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* não produziram esporos durante o período de incubação ou mesmo em outros cultivos (dados não mostrados). Apesar de inesperado, este resultado pode ser explicado pela riqueza nutricional do meio de cultura, as condições de incubação durante o cultivo e à diversidade dentro das espécies de fungo, visto que algumas raças de *M. phaseolina* podem não produzir esporos, permanecendo em sua fase esclerodial.

4.7.2.4 *Sclerotinia sclerotiorum* em BDA

Os filtrados de diferentes tempos de cultivo dos isolados ‘BAC 10’, ‘BAC 13’, ‘BAC 14’, ‘BAC 19’, ‘BAC 26’, ‘BAC 36’ e ‘BAC 49’ foram capazes de alterar o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Todavia, foi observado o aumento do diâmetro das colônias em relação à testemunha nesses tratamentos, característica que não condiz com a natureza antagonista das moléculas de interesse (Tabela 5.8).

O fungo não se mostrou sensível aos tratamentos citados e não foram observadas diferenças significativas de crescimento micelial entre a testemunha e os tratamentos utilizando os filtrados dos isolados ‘BAC 22’, ‘BAC 29’ e ‘BAC 33’.

É importante ressaltar que a escolha dos alvos em estudos de bioprospecção pode eliminar candidatos promissores. Por exemplo, se este estudo tivesse se baseado apenas no fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, concluíamos que boa parte dos isolados testados não produzem moléculas antifúngicas nas condições de cultivo utilizadas. Obviamente, a ineficiência das moléculas está relacionada unicamente a este fungo, logo as comparações com outros alvos deve ser cuidadosa.

Tabela 5.8 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de diâmetro de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* cultivado em meio BDA com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas cultivadas por diferentes períodos.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	80,50 b	-	80,50 b	-	80,50 b	-	80,50 b	-	80,50 a	-
10 horas	86,50 a	0,00	86,50 a	0,00	87,25 a	0,00	85,50 a	0,00	84,00 a	0,00
20 horas	86,00 a	0,00	86,25 a	0,00	87,75 a	0,00	85,75 a	0,00	84,75 a	0,00
30 horas	87,50 a	0,00	87,00 a	0,00	82,00 b	0,46	86,50 a	0,00	86,25 a	0,00
40 horas	87,00 a	0,00	85,50 a	0,00	85,50 a	0,00	85,50 a	0,00	83,00 a	0,00
CV (%)	2,24		3,58		3,25		3,35		3,21	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	80,50 b	-	80,50 a	-	80,50 a	-	80,50 b	-	80,50 b	-
10 horas	80,00 b	0,93	84,75 a	0,00	85,25 a	0,00	89,25 a	0,00	85,00 a	0,00
20 horas	86,00 a	0,00	82,75 a	0,00	83,75 a	0,00	84,00 b	0,00	86,25 a	0,00
30 horas	85,25 a	0,00	82,50 a	0,00	83,00 a	0,16	84,50 b	0,00	89,75 a	0,00
40 horas	89,00 a	0,00	81,25 a	0,62	86,00 a	0,00	85,25 b	0,00	85,50 a	0,16
CV (%)	2,74		2,43		2,73		3,04		3,62	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Entretanto, quando buscamos um microrganismo capaz de reduzir o crescimento de fungos maléficos, é interessante que a gama de alvos suscetíveis seja quanto maior possível. Esse quesito pode auxiliar no direcionamento de quais isolados merecem estudos futuros mais aprofundados quando o número de candidatos é alto e a investigação de cada um deles é inviável economicamente.

Um único isolado bacteriano pode ser utilizado para inibição de vários fitopatógenos, como visto pelo efeito do filtrado produzido a partir do cultivo de *B. velezensis* G341 em TSB por 96 horas, o qual foi pulverizado sobre as plantas em várias concentrações, seguida da inoculação dos patógenos após um dia da aplicação. Foram observados controles superiores a 70% em plantas de arroz com brusone por *M. oryzae*, queima-da-bainha do arroz por *Rhizoctonia solani*, podridão cinzenta do tomateiro por *Botrytis cinerae*, requeima do tomate por *Phytophthora infestans*, ferrugem da folha em trigo por *Puccinia recondita*, e antracnose em pimenta por *Colletotrichum coccodes*. O controle de oídio em cevada por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* foi de 50% (LIM et al., 2017).

Sansinenea et al. (2016) testaram 71 isolados de *Bacillus* contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris spp.* e *Alternaria spp.* O isolado ELI149 foi crescido em TSB por 7 dias e seu extrato bruto também apresentou propriedades antifúngicas contra todos os fitopatógenos testados, impedindo a

entrada de hifas e germinação de esporos ao redor do papel embibido com 10 µL extrato bruto na concentração de 300 mg/mL, porém os metabólitos bioativos não chegaram a ser identificados.

Filtrados de *Bacillus amyloliquefaciens* (UTB2) e *Bacillus subtilis* (UTB3) isolados de solo crescidos em TSB por 72 horas foram aplicados em poços no meio de cultura BDA usando a técnica de difusão com dose de 100 µL. Foram observados halos de inibição contra *Aspergillus parasiticus* NRRL2999, *A. carbonarius* ACCS19, *Penicillium expansum* CS19, *Fusarium graminearum* AC24, *F. oxysporum* sp *lycopersici* composto e *F. verticillioides* AD 12. O filtrado do isolado de *B. amyloliquefaciens* exibiu maior inibição comparado ao filtrado de *B. subtilis* (SIAHMOSHTEH et al., 2017). Os autores ainda comprovaram o caráter não proteico das moléculas bioativas, já que não houve diferença o potencial antifúngico entre filtrados digeridos ou não com proteinase K, o que indica a possibilidade dos metabólitos serem lipopeptídeos, como surfactinas, iturinas e fengicinas.

A ação de lipopeptídeos também foi descrita por Chen et al. (2016) ao testar filtrados de *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 tratados ou não com metanol contra *Botryosphaeria dothidea*, agente causal da podridão branca em maçãs. A inibição *in vitro* do patógeno chegou a ser de 86%, com aplicação de apenas 100 µL do filtrado sobre meio BDA anterior à inoculação do fungo por disco de micélio. A identificação da composição do filtrado indicou a presença de iturina A, confirmando a atividade antifúngica por lipopeptídeos. Além disso, análises de PCR identificaram a presença de genes responsáveis pela produção de outros lipopeptídeos bacilomicina D, bacilosina, ericina, fengicina e micosubtilina, os que não foram detectados no filtrado, mas são potencialmente produzidos pela estirpe de *B. amyloliquefaciens* PG12.

Foram observados halos de inibição ao redor de papel embebido com 10 µL de filtrado de *Bacillus subtilis* D1/2 dispostos em meio BDA semeado com macroconídios de *Fusarium graminearum*. (CHAN et al., 2003). Zhao, Mei e Xu (2016) também observaram inibição de *Fusarium oxysporum* pelo filtrado de *Bacillus subtilis* Y-IVI, o qual continha iturina A e fengicina.

A diversidade química de moléculas pertencentes a cada grupo de lipopeptídeos pode justificar os níveis de eficiência no biocontrole proporcionados por diferentes espécies e cepas do gênero *Bacillus* (ONGENA; JACQUES 2007).

Os filtrados podem ser produzidos a partir de elevados tempos de cultivo (48 a 168 horas) ou concentrados por liofilização. (CHAN; McCORMICK; SEIFERT, 2003; CHEN et al., 2016; LIM et al., 2017; SANSINENEA et al., 2016; ZHAO; MEI; XU, 2016), e suas

propriedades antifúngicas estão sujeitas às alterações nas condições de cultivo ou à manipulação dos filtrados.

Os filtrados produzidos pelas bactérias cavernícolas testadas nesse trabalho podem, então, ser otimizados para a produção de metabólitos bioativos para aumentar sua atividade antifúngica. Os tempos de cultivo utilizados aqui podem auxiliar estudos futuros que visem isolar e identificar os compostos responsáveis pela redução da velocidade de crescimento micelial de *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.8 PARTE II – FILTRADOS DE COCULTIVO BACTERIANO E FÚNGICO

As bactérias de monocultivo no segundo período não cresceram tanto quanto àquelas cultivadas no primeiro período, que ocorreu em abril de 2017, com exceção dos isolados ‘BAC 19’ e ‘BAC 49’ (Figura 5.3). Essa redução na absorbância é possivelmente explicada pelas variações de temperatura entre os meses de cultivo (Figura 5.4).

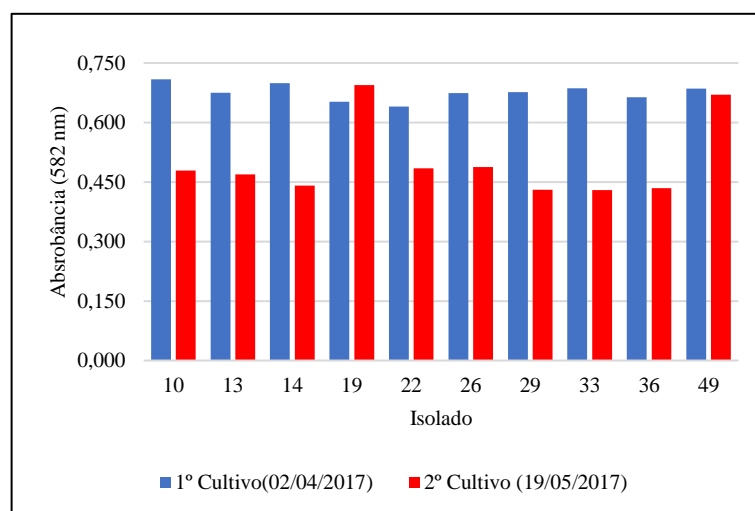


Figura 5.3 – Absorbância de caldo nutriente inoculado com isolados de bactérias cavernícolas cultivado por 40 horas em duas épocas.

O cultivo de caldo nutriente contendo apenas bactérias foi realizado novamente com o intuito de eliminar equívocos de comparação entre os filtrados de monocultivo com os filtrados de cocultivo bacteriano e fúngico. Uma vez que a quantidade de inóculo, o dia e duração do cultivo foram padronizados para a segunda época de cultivo, é possível comparar os três tipos de filtrados produzidos na segunda parte deste trabalho.

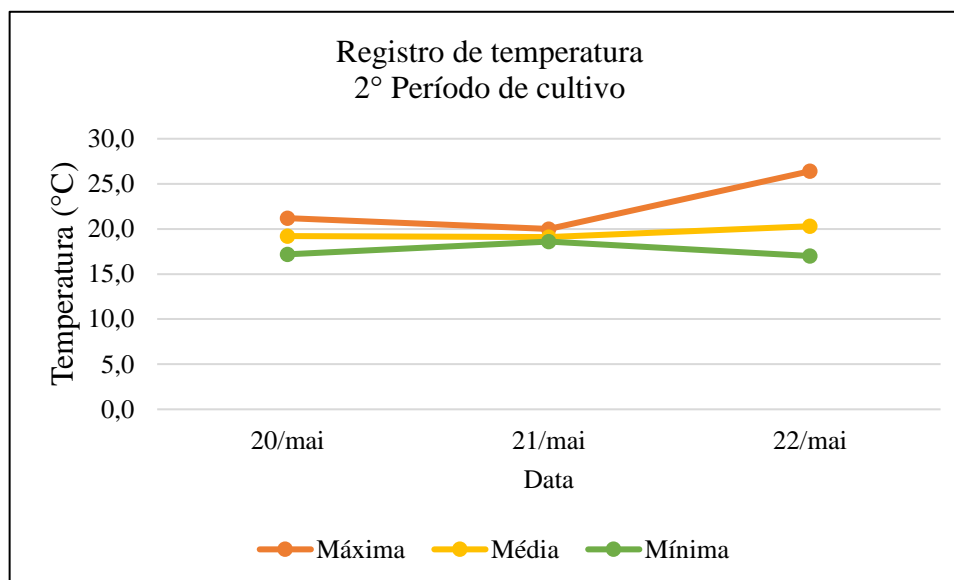


Figura 5.4 – Registro de temperaturas máximas, médias e mínimas durante o primeiro período de cultivo.

4.8.1.1 *Fusarium solani* F1 em Muerller-Hinton

Os filtrados dos isolados ‘BAC 10’, ‘BAC 13’, ‘BAC 26’ e ‘BAC 29’ não foram capazes de reduzir o crescimento micelial de *F. solani* F1 em relação à testemunha (Tabela 5.9). Mesmo os filtrados contendo apenas metabólitos bacterianos não apresentaram o efeito de inibição observado anteriormente após cultivo de 40 horas (Tabela 5.9). É possível que as condições diferentes entre os dois cultivos tenham influenciado no metabolismo microbiano.

A presença de *F. solani* F1 vivo durante o cultivo do isolado ‘BAC 33’ resultou em filtrado com potencial de inibição maior que o filtrado de monocultivo bacteriano, reduzindo o diâmetro das colônias de 82,25 mm para 76,50 mm (2,80 % de PIC). Contudo, o crescimento micelial no tratamento com filtrado contendo fungo vivo não diferiu da testemunha, que apresentou diâmetro de 78,25 mm. Para o isolado ‘BAC 33’, o filtrado contendo fungo morto resultou na maior redução do crescimento micelial, com diâmetro de 67,00 mm e 14,38 %.

Filtrados contendo fungo morto também foram responsáveis pela maior inibição do crescimento micelial de *F. solani* F1 nos tratamentos com os isolados ‘BAC 14’ (6,71%), ‘BAC 33’ (14,38%) e ‘BAC 36’ (6,39%).

Tabela 5.9 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de quatro repetições de diâmetro de colônias de *Fusarium solani* F1 cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	78,25 b	-	78,25 b	-	78,25 a	-	78,25 a	-	78,25 a	-
BAC	81,00 a	0,00	79,75 b	0,00	78,50 a	0,48	75,00 b	4,15	77,50 a	1,84
FM	77,75 b	1,20	78,00 b	0,80	73,00 b	6,71	73,75 b	5,75	78,25 a	0,48
FV	76,25 b	2,56	83,50 a	0,00	79,50 a	0,00	76,75 a	2,16	69,50 b	11,18
CV (%)	2,16		1,93		1,62		1,71		2,14	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	78,25 b	-	78,25 c	-	78,25 b	-	78,25 a	-	78,25 a	-
BAC	82,00 a	0,00	82,25 b	0,00	82,25 a	0,00	77,25 a	1,28	71,50 c	8,63
FM	80,25 a	0,00	77,00 c	1,60	67,00 c	14,38	73,25 b	6,39	78,25 b	1,44
FV	81,75 b	0,00	85,00 a	0,00	76,50 b	2,80	78,50 a	0,48	83,00 a	0,00
CV (%)	1,84		1,94		2,80		1,47		2,69	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

O cultivo apenas dos isolados bacterianos foi o tratamento com as maiores porcentagens de inibição para os isolados ‘BAC 49’ (8,63%) e ‘BAC 19’ (4,15%), contudo para o isolado ‘BAC 19’, esse valor não diferiu da média do filtrado cultivado com bactérias e o fungo morto (5,75%).

O cocultivo de bactérias cavernícolas com *F. solani* F1 apresentou resultados dependentes do isolado utilizado, como visto pelo incremento significativo do potencial inibidor do filtrado com fungo vivo e o isolado ‘BAC 22’ (11,18%).

4.8.1.2 *Fusarium solani* F2 em Mueller-Hinton

O filtrado de cocultivo de *F. solani* F2 e ‘BAC 10’ apresentou potencial inibidor semelhante ao filtrado de monocultivo deste isolado bacteriano. Ambos os tratamentos foram responsáveis por reduzir o crescimento micelial deste fungo de 86,75 mm de diâmetro para 73,00 mm e 70,00 mm, em mono e cocultivo, respectivamente, resultando em 15,90% e 19,35% de porcentagem de inibição (Tabela 5.10).

Resultados semelhantes foram observados para o isolado ‘BAC 49’, com filtrados de mono e cocultivo que inibiram o crescimento micelial, porém com valores menores, de 6,68% e 5,24%, respectivamente. O cocultivo com *F. solani* F2 também foi responsável pela

maior inibição do crescimento micelial na produção do filtrado com o isolado ‘BAC 22’, com 18,78% de inibição.

Tabela 5.10 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de quatro repetições de diâmetro de colônias de *Fusarium solani* F2 cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo.

TRAT	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	86,75 a	-	86,75 a	-	86,75 a	-	86,75 a	-	86,75 b	-
BAC	73,00 b	15,90	70,50 c	18,78	68,50 c	21,08	75,25 c	13,31	90,75 a	0,00
FM	84,25 a	3,00	68,25 c	21,37	86,75 a	0,00	85,50 a	1,78	80,75 c	6,97
FV	70,00 b	19,35	83,00 b	4,38	73,50 b	15,32	80,50 b	7,26	70,50 d	18,78
CV (%)	2,53		2,00		3,42		3,26		2,66	
TRAT	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	86,75 a	-	86,75 a	-	86,75 a	-	86,75 a	-	86,75 a	-
BAC	76,25 b	12,15	87,25 a	1,04	83,00 b	4,38	72,00 b	17,05	81,00 c	6,68
FM	84,00 a	3,22	74,50 b	14,17	69,50 d	19,93	73,00 b	15,90	84,25 b	3,00
FV	86,25 a	1,32	87,00 a	0,23	79,50 c	8,41	83,25 a	4,09	82,25 c	5,24
CV (%)	2,41		2,97		2,58		3,47		1,70	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

Resultados semelhantes foram observados para o isolado ‘BAC 49’, com filtrados de mono e cocultivo que inibiram o crescimento micelial, porém com valores menores, de 6,68% e 5,24%, respectivamente. O cocultivo com *F. solani* F2 também foi responsável pela maior inibição do crescimento micelial na produção do filtrado com o isolado ‘BAC 22’, com 18,78% de inibição.

O tratamento com fungo morto e o isolado ‘BAC 13’ resultou em colônias com diâmetro semelhante ao tratamento contendo apenas metabólitos bacterianos, porém, ambos os resultados foram significativamente menores que a média da testemunha, com valores de inibição de 18,78% a 21,37%. Esse resultado também foi observado para os respectivos tratamentos usando o isolado ‘BAC 36’, com redução do crescimento micelial em 15,90% a 17,05%. A adição do fungo morto aos isolados ‘BAC 29’ e ‘BAC 33’, por sua vez, demonstrou maior potencial inibidor dentre os filtrados para esses isolado bacterianos, com colônias de 74,50 mm de diâmetro (14,17 % de inibição) e 69,50 mm de diâmetro (19,93 % de inibição), respectivamente.

O cocultivo de *F. solani* F2 com os isolados ‘BAC 14’ e ‘BAC 19’ produziu filtrados com capacidade de reduzir o crescimento micelial das colônias em comparação às

testemunhas, 21,08% e 13,31%, respectivamente. Contudo, as médias desses tratamentos foram inferiores aos valores encontrados quando os filtrados de monocultivo foram aplicados. Esse resultado foi observado também com uso do filtrado de monocultivo do isolado ‘BAC 26’, todavia, esse tratamento foi o único capaz de reduzir o crescimento micelial, em 12,15% em relação à testemunha.

4.8.1.3 *Macrophomina phaseolina* em Muerller-Hinton

Os filtrados ‘BAC 10’, ‘BAC 14’ e ‘BAC 26’ em mono e cultivo com fungo morto apresentaram os maiores potenciais de inibição ao crescimento de *M. phaseolina* em relação aos demais tratamentos. Foram observadas inibições de 48,97% a 59,02%, 45,36% a 53,87% e 27,66% a 30,24%, respectivamente (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de quatro repetições de diâmetro de colônias de *Macrophomina phaseolina* cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo.

	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
TRAT	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	48,50 a	-	48,50 a	-	48,50 a	-	48,50 a	-	48,50 a	-
BAC	24,75 c	48,97	48,75 a	3,09	26,50 c	45,36	42,30 b	12,78	44,25 a	9,54
FM	19,88 c	59,02	23,00 c	52,58	22,38 c	53,87	33,25 c	31,44	31,50 b	35,05
FV	39,00 b	19,59	39,50 b	18,57	34,25 b	29,38	28,83 c	40,55	36,75 b	24,23
CV (%)	10,76		9,17		13,43		7,98		8,80	
	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
TRAT	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	48,50 b	-	48,50 a	-	48,50 a	-	48,50 a	-	48,50 a	-
BAC	35,08 c	27,66	47,75 a	4,12	47,25 a	4,38	52,75 a	2,58	45,75 a	6,96
FM	33,83 c	30,24	46,75 a	8,25	36,33 b	25,08	47,75 a	4,64	35,50 b	26,80
FV	54,75 a	0,00	40,75 a	15,98	20,50 c	57,73	29,50 b	39,18	45,75 a	5,93
CV (%)	7,88		10,43		10,12		12,23		8,57	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

A adição de *M. phaseolina*, tanto morto quanto vivo, para o cultivo dos isolados ‘BAC 19’ e ‘BAC 22’, resultaram nas menores colônias para esses tratamentos. ‘BAC 19’ apresentou inibição de crescimento variando de 31,44% a 40,55%, enquanto o isolado ‘BAC 22’ demonstrou valores de 24,23% a 35,05%.

O cultivo dos isolados ‘BAC 33’ e ‘BAC 36’ com o fungo foi capaz de

umentar o potencial antifúngico dos filtrados desses tratamentos, com valores de 57,73% e 39,18%, respectivamente. Entretanto, esse efeito foi observado para o tratamento com ‘BAC 13’ e ‘BAC 49’, com adição do fungo morto para o cultivo desses isolados, resultando em 52,58% e 26,80% de inibição, respectivamente.

A adição de fungo morto ao cultivo dos isolados ‘BAC 13’ e ‘BAC 49’ resultou nos maiores valores de inibição para esses tratamentos, com médias de 52,58% e 26,80%, respectivamente.

O isolado ‘BAC 29’ não foi capaz de reduzir o crescimento micelial de *M. phaseolina* em nenhum dos tipos de cultivos testados. Esse resultado pode ser explicado pelas condições de cultivo utilizados na produção dos filtrados, visto que experimento anterior (Tabela 5.3), o isolado ‘BAC 29’ cultivado por 40 horas apresentou maior potencial inibidor desse patógeno.

Os valores de coeficiente de variação elevados encontrados nos experimentos com *M. phaseolina* podem ser justificados pelo comportamento irregular de crescimento radial das colônias deste patógeno, observado quando o cultivo foi realizado em meio Mueller-Hinton.

4.8.1.4 *Sclerotinia sclerotiorum* em Mueller-Hinton

Os tratamentos com ‘BAC 10’ e ‘BAC 13’ em monocultivo ou cultivo com adição do fungo morto resultaram nos maiores valores de inibição para esses isolados, com médias de 33,73% a 34,63% e 38,51% a 43,88%, respectivamente (Tabela 5.12).

O isolado ‘BAC 14’ não apresentou inibição do crescimento de *S. sclerotiorum* em comparação às testemunhas, independentemente do tipo de cultivo testado. Esse resultado também foi observado em experimento anterior (Tabela 5.4), o que reforça a evidência que esse isolado não produz moléculas com potencial antifúngico a este patógeno.

O monocultivo foi o tipo de cultivo que resultou em maiores porcentagens de inibição para os isolados ‘BAC 22’ (4,18%), ‘BAC 26’ (42,59%), ‘BAC 29’ (25,37%) e ‘BAC 49’ (31,94%). Contrariamente, a adição de fungo morto para cultivo com os isolados ‘BAC 19’, ‘BAC 33’ e ‘BAC 36’ produziu filtrados com potencial de inibição de 37,61%, 14,92% e 28,06%, respectivamente.

A alteração do potencial antifúngico de filtrados bacterianos pode ser explicada por alterações como competição entre organismos ou pela liberação de moléculas fúngicas. As moléculas fúngicas podem ter ação sinérgica, quando funcionam como precursoras a metabólitos bacterianos em cocultivo, ou ação antagonista, quando inibem a expressão de

genes por alterações epigenéticas, conforme descrito por Wakefield et al., (2017).

Tabela 5.12 - Comparação de médias, por teste de Scott-Knott, de quatro repetições de diâmetro de colônias de *Sclerotinia sclerotiorum* cultivado em meio Mueller-Hinton com aplicação de filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo.

	BAC 10		BAC 13		BAC 14		BAC 19		BAC 22	
TRAT	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	83,75 a	-	83,75 a	-	83,75 b	-	83,75 a	-	83,75 c	-
BAC	55,50 c	33,73	51,50 c	38,51	80,75 b	3,58	74,00 b	11,64	80,25 c	4,18
FM	54,75 c	34,63	47,00 c	43,88	87,08 a	0,00	52,25 c	37,61	95,21 b	0,00
FV	60,25 b	28,06	72,00 b	14,03	86,54 a	0,62	86,54 a	2,54	100,08 a	0,00
CV (%)	3,12		5,48		3,17		6,61		3,29	
	BAC 26		BAC 29		BAC 33		BAC 36		BAC 49	
TRAT	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC	DIAM	PIC
Testemunha	83,75 b	-	83,75 c	-	83,75 b	-	83,75 b	-	83,75 b	-
BAC	48,08 c	42,59	62,50 d	25,37	82,00 b	2,16	84,25 b	1,04	57,00 c	31,94
FM	82,75 b	1,34	94,00 a	0,00	71,25 c	14,92	60,25 c	28,06	82,25 b	1,85
FV	95,75 a	0,00	88,50 b	0,00	89,25 a	0,00	91,42 a	0,00	97,92 a	0,00
CV (%)	4,43		2,24		2,53		2,56		3,12	

DIAM = diâmetro (mm); PIC = porcentagem de inibição do crescimento micelial (%); CV = coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente a 0,05 de nível de significância pelo teste de Scott-Knott. Fonte: o próprio autor.

A alteração do potencial antifúngico de filtrados bacterianos pode ser explicada por alterações como competição entre organismos ou pela liberação de moléculas fúngicas. As moléculas fúngicas podem ter ação sinérgica, quando funcionam como precursoras a metabólitos bacterianos em cocultivo, ou ação antagonista, quando inibem a expressão de genes por alterações epigenéticas, conforme descrito por Wakefield et al., (2017).

Esses autores conseguiram isolar o metabólito chaxapeptina 7 pelo cocultivo de *Aspergillus fumigatus* MR2012 e *Streptomyces leeuwenhoekii* C34, o qual não havia sido encontrado em cultivos axênicos (monocultivo), apesar do potencial de produção ter sido detectado por estudos de metagenômica. Outras divergências também foram observadas, como a ausência de todos os metabólitos bacterianos anteriormente expressados, com exceção de nocardamina, e a predominância de compostos de origem fúngica, não encontrados no cultivo axênico de *A. fumigatus*.

Foi perceptível que a resposta do cocultivo pode ser positiva ou negativa dependendo da combinação entre isolado e patógeno utilizada. A sinergia entre os fungos testados e as bactérias cavernícolas pode ser explicada pelo maior acúmulo dos mesmos metabólitos bacterianos ou pela liberação de metabólitos liberados unicamente em condições de cocultivo.

Entretanto, não é possível elucidar o mecanismo de ação dos fungos utilizados em cocultivo com os isolados de bactérias cavernícolas testados neste trabalho, uma vez que a identificação dos compostos não foi realizada.

4.9 PARTE III – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FILTRADOS BACTERIANOS

A atividade enzimática dos filtrados de bactérias cavernícolas teve tendência de aumentar ao longo do tempo de cultivo dos isolados (Figura 5.5).

Atividade amilolítica foi observada nos filtrados de 10 horas dos isolados ‘BAC 13’, ‘BAC 14’, ‘BAC 19’, ‘BAC 26’, ‘BAC 33’, ‘BAC 36’ e ‘BAC 49’, sendo que os únicos halos de degradação com diâmetro médio superior a 10 mm foram encontrados nos filtrados das ‘BAC 33’ e ‘BAC 36’ (Figura 5.5). O filtrado do isolado ‘BAC 22’ cultivado por 10 horas não apresentou atividade amilolítica.

Houve aumento da atividade de amilases ao longo dos períodos de cultivo para todos os isolados, com halos de degradação próximos de 15 mm, com exceção dos filtrados de ‘BAC 33’ e ‘BAC 36’, que apresentaram halos próximos de 20 mm nos filtrados de 40 horas, evidenciando que esses isolados produzem amilases em maior quantidade.

A atividade de celulases foi observada no tempo de 10 horas apenas para os filtrados dos isolados de ‘BAC 10’, ‘BAC 33’ e ‘BAC 36’, sendo que esses dois últimos apresentaram halos de degradação próximos a 10 mm. Houve acúmulo de celulases para todos os isolados ao longo do tempo de cultivo (Figura 5.5).

Halos de degradação de proteínas foram observado no tempo de 10 horas apenas para o filtrado do isolado ‘BAC 36’ (Figura 5.5). Contudo, houve acúmulo de proteases nos demais tempos de cultivo para todos os filtrados, resultando em halos de degradação maiores que 15 mm no tempo de 40 horas. Siahmoshteh et al. (2017) também constataram a atividade de proteases de filtrados de *Bacillus amyloliquefaciens* (UTB2) e *Bacillus subtilis* (UTB3), identificada pela formação de halos de degradação de 10 mm de diâmetro ao redor dos poços em ágar gelatina após aplicação de 100 µL dos filtrados e incubação a 37 °C por uma noite.

A observação de halos de degradação indicando a atividade de endoglucanases e pectinases foi possível somente 24 horas após a revelação com brometo cetiltrimetil amônio. Os halos com diâmetros maiores para a atividade dessas enzimas pode ser justificado pelo maior

tempo de incubação, conforme preconizado pelo protocolo experimental. Contudo, não foi de interesse deste trabalho comparar a atividade de degradação entre as enzimas.

A atividade endoglucanólítica foi observada dentre os filtrados de 10 horas apenas para os isolados 'BAC 33' e 'BAC 36', apesar do posterior acúmulo de endoglucanases ao longo do tempo de cultivo para todos os isolados.

Halos de degradação de pectina foram observados após a aplicação dos filtrados de 10 horas dos isolados 'BAC 14', 'BAC 26', 'BAC 33' e 'BAC 36'. Os filtrados com os demais períodos de cultivo demonstraram acúmulo de pectinases após 20 horas.

Dessa forma, pode-se afirmar que os isolados produzem enzimas líticas capazes de degradar celulose, amido, proteínas e pectina com acúmulo crescente ao longo do tempo de cultivo para fabricação dos filtrados. A ação de enzimas líticas pode aumentar a eficiência de moléculas antifúngicas por permeabilizar a parede celular dos patógenos, expondo a célula aos metabólitos bioativos. O filtrado de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B359 produzido por Fogliano et al., (2002) apresentou acúmulo dos lipopeptídeos seringomicina E e seringopeptina 25A e enzimas quitinolíticas e glucanólíticas. Após o isolamento dos lipopeptídeos, esses foram testados com adição de enzimas líticas endoquitinase e glucanase contra *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerae*, *Penicillium expansum*, *Phytophthora infestans*, *Rhodotorula pilimanae*, *Trichoderma atroviridae*, resultando em sinergismo entre a dose crescente de enzimas líticas e a ação antifúngica de seringomicina E e seringopeptina 25A.

Esse mecanismo de antagonismo pode explicar a correlação estatisticamente significativa observada entre a redução da velocidade de crescimento micelial de *Fusarium solani* F1 em Mueller-Hinton e o aumento da atividade de enzimas líticas (-0,54, para atividade celulolítica, -0,55, para atividade proteolítica e -0,61, para atividade amilolítica, -0,59, para atividade endoglucanólítica e -0,56, para atividade pectinolítica) nos filtrados testados (Figura 5.6). Correlações fortes são expressas por elipses mais estreitas, enquanto o sentido da correlação é representado pela cor azul (positiva) e vermelha (negativa).

Os fungos *Fusarium solani* F1, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* não demonstraram crescimento micelial correlacionado com a atividade enzimática das enzimas avaliadas ($p < 0,05$).

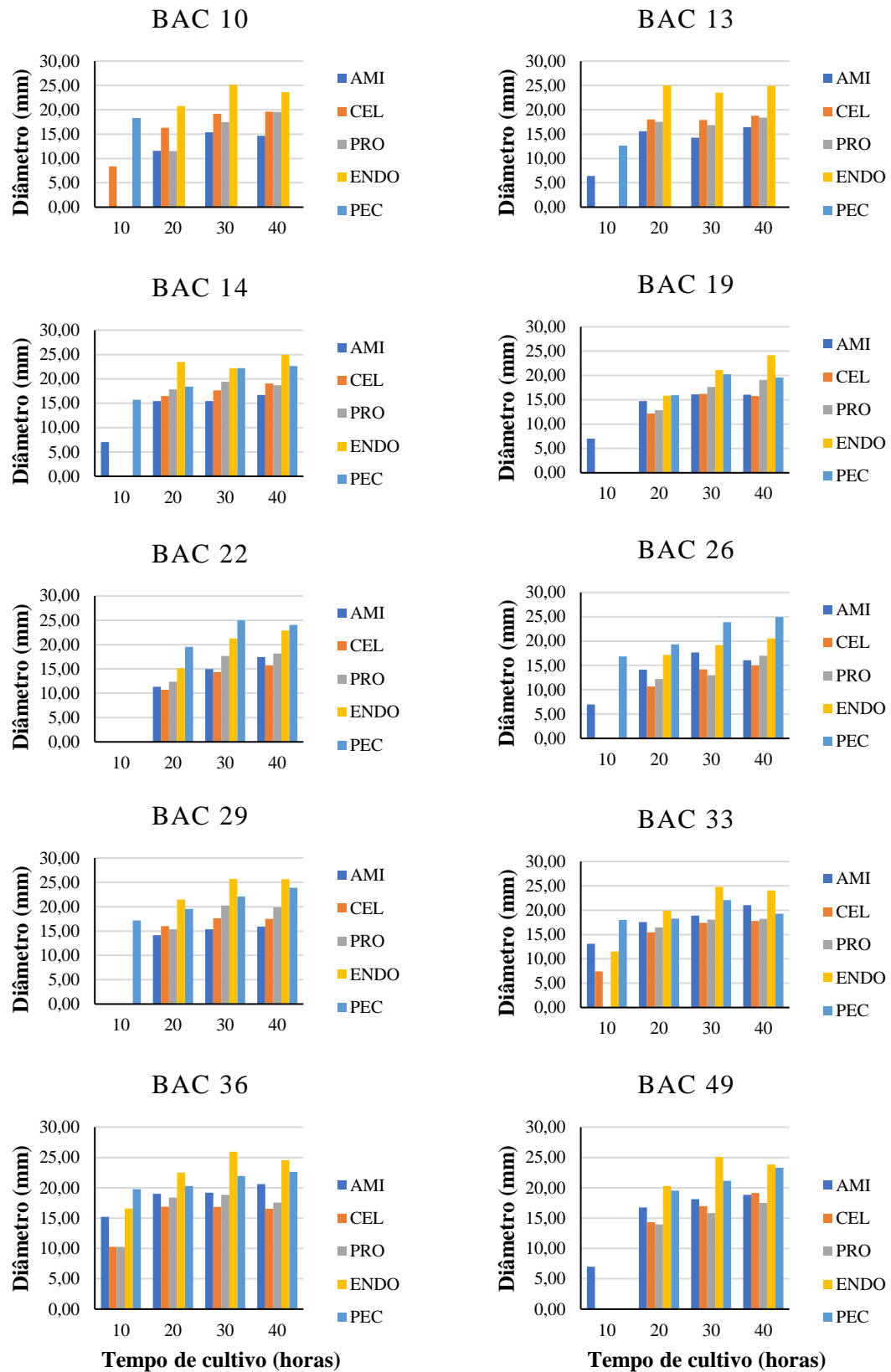


Figura 5.5 – Atividade enzimática de filtrados de bactérias cavernícolas ao longo do tempo de cultivo líquido. Dados medidos em milímetros de halos de degradação de substrato em meio sólido. AMI = atividade de amilases; CEL = atividade de celulases; PRO = atividade de proteases; ENDO = atividade de endoglucanases; PEC = atividade de pectinases.

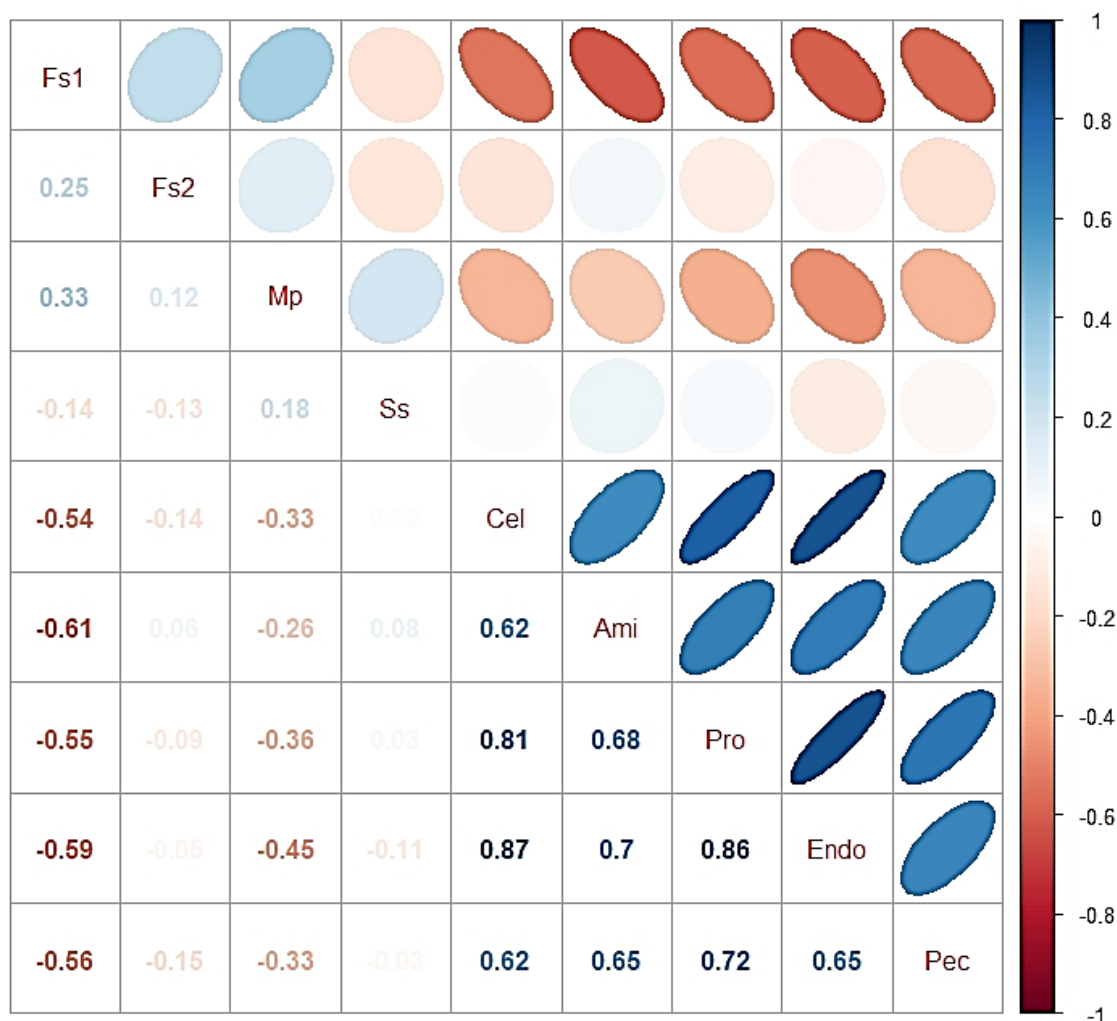


Figura 5.6 – Gráfico de correlação de Spearman entre IVCM de *Fusarium solani* F1 (Fs1), *Fusarium solani* F2 (Fs2), *Macrophomina phaseolina* (Mp) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) cultivados em Muller-Hinton e atividade celulolítica (Cel), amilolítica (Ami), proteolítica (Pro), endoglucanolítica (Endo) e pectinolítica (Pec) de filtrados de bactérias cavernícolas ao longo do tempo de cultivo líquido.

A análise de componentes principais foi capaz de resumir e separar os filtrados quanto à atividade enzimática e aos índices de velocidade de crescimento micelial dos fungos testados.

A atividade de celulases, amilases e proteases demonstraram maiores cargas no primeiro componente para todos os fungos testados (Tabela 5.13). Esse resultado foi capaz de separar os tratamentos entre os quadrantes à esquerda ou à direita do eixo vertical. Para todos os fitopatógenos, o IVCM foi a variável com maior peso no segundo componente, dividindo então, os tratamentos entre os quadrantes inferiores ou superiores de acordo com suas médias.

Tabela 5.13 – Cargas dos componentes para os fungos *Fusarium solani* F1, *Fusarium solani* F2, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* em análise de componentes principais para filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo.

Variável	<i>F. solani</i> F1		<i>F. solani</i> F2		<i>M. phaseolina</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 1	Comp. 2
IVCM	-0,093	0,950	0,134	0,837	0,180	0,979	-0,061	0,991
CEL	0,622	-0,064	-0,337	0,541	-0,599	0,164	0,620	0,108
AMI	0,601	-0,035	-0,642	-0,022	-0,608	0,123	0,606	0,042
PRO	0,492	0,304	-0,676	-0,082	-0,490	0,006	0,494	0,108

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; CEL = atividade celulolítica; AMI = atividade amilolítica; PRO = atividade proteolítica. Fonte: o próprio autor.

Tratamentos representados no mesmo quadrante que o vetor significam maiores médias para a variável em questão. Os tratamentos testemunha foram distintamente alocados nos quadrantes para todos os fungos. Esse resultado é explicado pela ausência de enzimas nesses tratamentos, como visto pela representação da testemunha (T) em quadrantes opostos aos vetores das variáveis de atividade enzimática (Figura 5.7).

Todos os filtrados dos isolados ‘BAC 19’ e ‘BAC 22’ estão localizados em quadrantes opostos aos vetores de atividade enzimática, evidenciando que esses isolados não produzem amilases, proteases e celulasas em alta concentração.

Dentre os tratamentos com menores médias de IVCM de *F. solani* F1, foram observados os filtrados 22 FM (fungo morto), 22 BAC (isolado bacteriano), 19 FV (fungo vivo), 19 BAC, 19 FM e 22 FV, em ordem decrescente e à esquerda do eixo vertical, e 29 FM, 10 FV, 36 FM, 14 FM, 49 BAC e 33 FM, no quadrante contendo os vetores de enzimas, indicando que esses filtrados possuem também atividade enzimática maior. Os filtrados que apresentaram menores valores de IVCM de *F. solani* F2 e maior atividade enzimática foram 13 FM, 33 FM, 36 FM, 10 BAC, 13 BAC, 14 BAC, 29 FM, 33, FM, 26 BAC e 19 BAC, em ordem decrescente.

Os filtrados 10 FV, 13 FM, 49 FM, 33 FM, 26 BAC, 14 FV, 10 FM, 14 BAC, 36 FV, 10 BAC e 33 FV apresentaram os menores valores de IVCM para *M. phaseolina* além de maior atividade amilolítica, celulolítica e proteolítica. Os resultados para *S. sclerotiorum* demonstraram maior atividade enzimática e menores médias de IVCM para os filtrados 13 FV, 33 FM, 29 BAC, 10 FV, 14 BAC, 10 BAC, 10 FM, 13 BAC, 13 FM e 26 FM.

O efeito do cocultivo sobre a atividade enzimática dos filtrados se mostrou dependente da combinação com isolado bacteriano cavernícola utilizado. Os filtrados que apresentaram potencial inibidor mesmo com atividade enzimática reduzida provam que enzimas líticas podem agir sinergicamente com metabólitos antifúngicos, porém não são

unicamente responsáveis pela redução do crescimento micelial dos fungos testados.

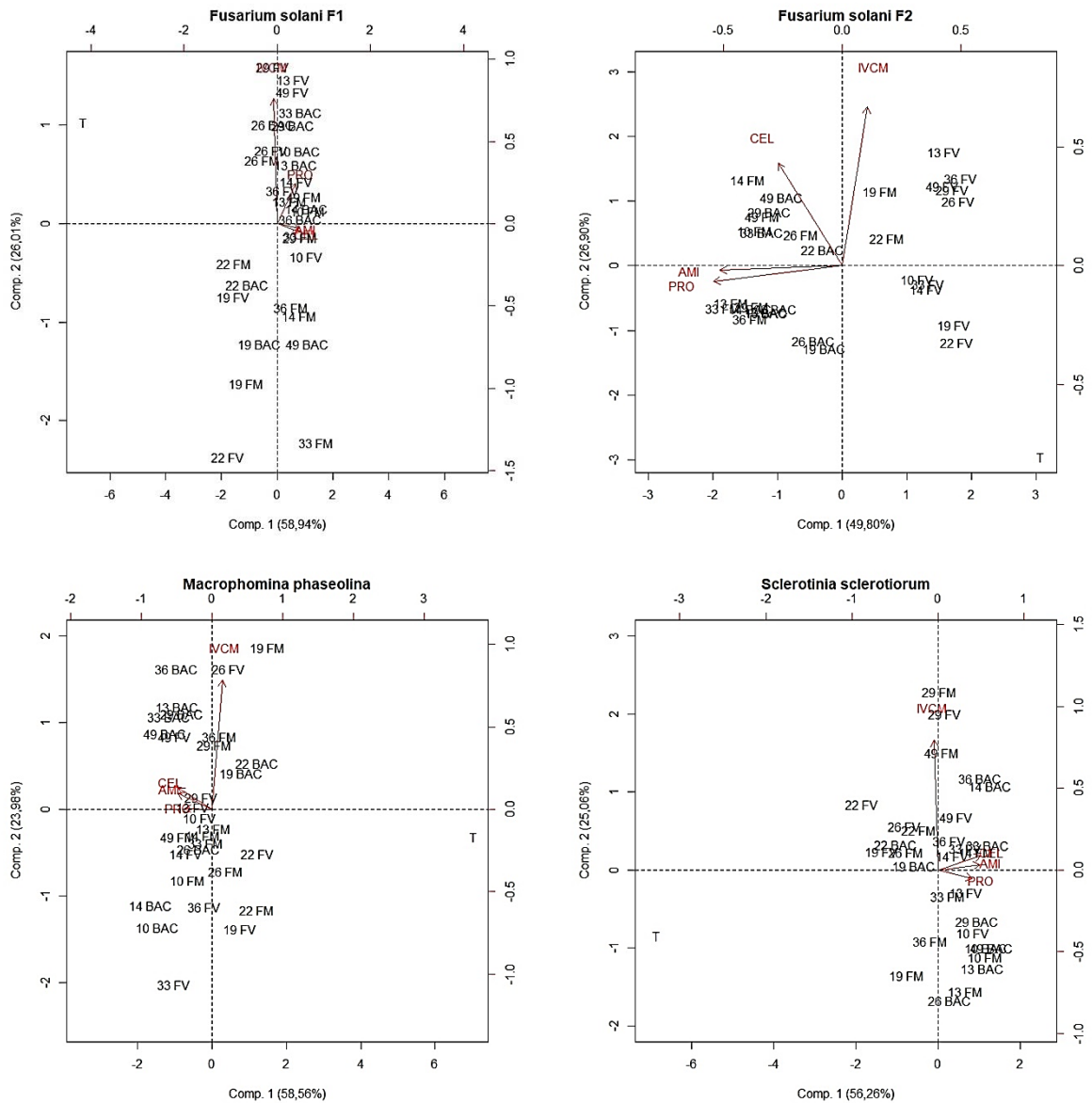


Figura 5.7 – Gráficos dos dois primeiros componentes principais para relação entre o índice do crescimento micelial de *Fusarium solani* F, *Fusarium solani* F2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* cultivados em Muller-Hinton e a atividade celulolítica (CEL), amilolítica (AMI), proteolítica (PRO) de filtrados de bactérias cavernícolas ao em monocultivo (BAC), cultivo com adição de fungo morto (FM) e cocultivo com fungo vivo (FV).

5 CONCLUSÃO

Os filtrados de bactérias cavernícolas produzidos em monocultivo apresentaram potencial antagonista aos fungos *Fusarium solani* F1, *Fusarium solani* F2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A redução da velocidade do crescimento micelial é dependente do isolado utilizado, do tempo de cultivo e do alvo escolhidos.

O efeito do cocultivo de bactérias cavernícolas com os fungos testados é dependente da combinação entre o fitopatógeno e o isolado bacteriano.

Os filtrados contém, além de compostos com características antifúngicas, enzimas líticas que foram correlacionadas com a redução do IVCN de *Fusarium solani* F1.

A atividade enzimática dos filtrados de bactérias cavernícolas em cocultivo com os fungos testados foi alterada. Não é obrigatória a alta atividade de enzimas líticas nos filtrados bacterianos para que inibição seja observada.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. F. B. Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safras na Região Sul de Minas Gerais: Doenças e Métodos de Controle. 2005. Embrapa arroz e feijão. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/doencas.htm#mb>>. Acesso em: 01 dezembro de 2017.
- ALMEIDA, A. C. et al. Bioprospecting of cave bacteria with antifungal activity. **Planta medica**, v. 81, n. S 01, p. S1, 2016.
- AMBRICO, A.; TRUPO, M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 134, p. 5-10, 2017.
- AZEVEDO, P. F. **Biocontrole in vitro de *Fusarium solani* isolado de mandioca**. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em agronomia). Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2017.
- AXENOV-GIBANOV, D. V. et al. Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the biggest conglomeratic karstic cave in Siberia as sources of novel biologically active compounds. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BARTON, H. A.; NORTHUP, D. E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. **Journal of Cave and Karst Studies**, v. 69, n. 1, p. 163-178, 2007.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- CHAN, Y.; MCCORMICK, W. A.; SEIFERT, K. A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 253-262, 2003.
- CHARLOP-POWERS, Z. et al. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. **Elife**, v. 4, p. e05048, 2015.
- CHEN, X. et al. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biology and Technology**, v. 115, p. 113-121, 2016.

CHENG, M. et al. Antifungal activity and identification of active compounds of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* against *Botryosphaeria dothidea*. **Forest Pathology**, p. 1-8, 2016.

COMPANT, S. et al. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. **BioControl**, v. 58, n. 4, p. 435-455, 2013.

COUTTE, F. et al. Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. **Biotechnology journal**, vol.12, n. 7, 2017.

CRANEY, A.; AHMED, S.; NODWELL, J. Towards a new science of secondary metabolism. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 7, p. 387-400, 2013.

DAVIES, J. Specialized microbial metabolites: functions and origins. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 7, p. 361-364, 2013.

DEISING, H. B.; GASE, I.; KUBO, Y. The unpredictable risk imposed by microbial secondary metabolites: how safe is biological control of plant diseases?. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 124, n. 5, p. 413-419, 2017.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. **Academic Press**, 1980, 859p.

FOGLIANO, V. et al. *Pseudomonas* lipodepsipeptides and fungal cell wall-degrading enzymes act synergistically in biological control. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 15, n. 4, p. 323-333, 2002.

GHOSH, S. et al. In Situ Cultured Bacterial Diversity from Iron Curtain Cave, Chilliwack, British Columbia, Canada. **Diversity**, v. 9, n. 3, p. 36-51, 2017.

GHOSH, S.; KUISIENE, N.; CHEEPHTAM, N. The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream?. **Biochemical pharmacology**, v. 134, p.18-34, 2016.

GODOY, P.; COLOMBO, A.L. Biologia e relevância clínica do gênero *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, v.34, p.136-140, 2004.

GUZMAN-DE-PEÑA, D.; RUIZ-HERRERA, J. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. **Fungal Genetic Biology**, v. 21, p. 198–205, 1997.

HAN, J. et al. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 2, p. 165, 2015.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n.3, p. 597-607, 1975.

KAI, M. et al. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 5, p. 351-360, 2007.

KAMBESIS P 2007. The importance of cave exploration to scientific research. **Journal of Cave and Karst Studies**, v.69, p. 46–58.

KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 4, p. 206-211, 2015.

KLUSAITE, A. et al. Characterization of antimicrobial activity of culturable bacteria isolated from Krubera-Voronja Cave. **International Journal of Speleology**, v. 45, n. 3, p. 275-287, 2016.

LAMPRINO, V. et al. Cave Cyanobacteria showing antibacterial activity. **International Journal of Speleology**, v. 44, n. 3, p. 231-238, 2015

LIGON, J. M. et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science**, v. 56, n. 8, p. 688-695, 2000.

LIM, S. M. et al. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal**, v. 33, n. 5, p. 488-498, 2017.

MALIK, V. S. Microbial secondary metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 68-72, 1980.

MIHALACHE, G. et al. Lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2017.

MONCIARDINI, P. et al. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.

NAGARAJKUMAR, M.; BHASKARAN, R.; VELAZHAHAN, R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. **Microbiological Research**, v. 159, n. 1, p. 73-81, 2004.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.).1991. 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade), Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; KUROZAWA, C. Doenças da alface (*Lactuca sativa*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN

FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, cap.6, p.27-33.

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

RIQUELME, C. et al. Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 843-857, 2017.

SANSINENEA, E. et al. Cellular damage of plant pathogenic fungi by antifungal compounds produced by *Bacillus* spp. isolates. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 722-732, 2016.

SIAHMOSHTEH, F. et al. Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, 2017.

SINCLAIR, J. B., BACKMAN, P. A. (Eds.). **Compendium of soybean disease**. 3. ed. American Phytopathological Society. 1989,116 p.

SILVA, A. N. **Efeito de produtos químicos de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium solani* do maracujazeiro.** 2011. 53 f. Dissertação (Mestrado em agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011

SOARES, D. J.; COUTINHO, W. M.; ARAÚJO, A. E. **Doenças: Podridão negra do caule.** Embrapa. Disponível em:
<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona/arvore/CONT000gzv5h6rt02wx7ha07d3364xgbb6z7.html>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2017.

WAKEFIELD, J. et al. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1284, 2017

YASIR, M. Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017.

ZHAO, Q. et al. Isolation and identification of antifungal compounds produced by *Bacillus* Y-IVI for suppressing *Fusarium* wilt of muskmelon. **Plant Protection Science**, v. 52, n. 3, p. 167-175, 2016.