



**ALTERNATIVA SUSTENTÁVEL DE USO DE *Bacillus amyloliquefaciens*
NO BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS: UMA REVISÃO**

Luciana de Paiva Santos Abreu¹

Ana Paula Martinazzo¹

Carlos Eduardo de Souza Teodoro¹

Pedro Amorim Berbert²

RESUMO

Atualmente a crescente preocupação com questões ambientais relacionadas ao uso de defensivos agrícolas químicos levou à busca de novas tecnologias para atuar como substitutas no manejo de pragas e doenças. Neste cenário surgiram múltiplos estudos nos quais foram testadas diferentes cepas da espécie bacteriana gram-positiva *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de microrganismos fitopatogênicos, inclusive fungos. A bactéria apresentou bons resultados também na promoção do crescimento de algumas espécies de plantas. Através de levantamento bibliográfico, a proposta deste trabalho foi realizar um estudo dos principais resultados obtidos nas pesquisas, assim como o mecanismo de ação pelo qual a bactéria age visando o controle do crescimento dos fungos. Uma classe de biossurfactantes, os lipopeptídeos foi identificada como a principal responsável pela inibição dos fungos. Dentre eles os que se mostraram mais relevantes foram a iturina, a surfactina e a fengicina. Através desta pesquisa é possível avaliar novas alternativas sustentáveis para reduzir ou até mesmo eliminar algumas espécies de fungos responsáveis por grandes perdas na agricultura.

Palavras-chave: Controle Biológico; Lipopeptídeos; Antifúngico; Antagonista.

ABSTRACT

Sustainable alternative for the use of *Bacillus amyloliquefaciens* in the biocontrol of phytopathogenic fungi: a review. Currently, the growing concern about environmental issues related to the use of chemical pesticides has led to the search for new technologies to act as substitutes in the management of pests and diseases. In this scenario, multiple studies emerged in which different strains of the gram-positive bacterial species *Bacillus amyloliquefaciens* were tested in the biocontrol of phytopathogenic microorganisms, including fungi. The bacterium also showed good results in promoting the growth of some plant species. Through a bibliographic survey, the purpose of this work was to carry out a study of the main results obtained in the research, as well as the mechanism of action by which the bacterium acts in order to control

1 PPG em Tecnologia Ambiental, Universidade Federal Fluminense – UFF, Volta Redonda, RJ, Brasil. E-mail para correspondência: luciana_paiva@id.uff.br

2 Laboratório de Engenharia Agrícola - LEAG, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil.

the growth of fungi. A class of biosurfactants, lipopeptides, has been identified as the main responsible for fungal inhibition. Among them, the most relevant were iturin, surfactin and fengicin. Through this research it is possible to evaluate new sustainable alternatives to reduce or even eliminate some species of fungi responsible for large losses in agriculture.

Keywords: Biological Control; Lipopeptides; Antifungal; Antagonist.

INTRODUÇÃO

Uma série de doenças que atingem plantas, grãos e alimentos, são causadas por microrganismos. Dentre eles, os fungos e bactérias patogênicos são uma das maiores preocupações, causando grandes danos econômicos em plantações (Bandara et al., 2020). Dentre os grandes responsáveis pelo uso exacerbado de agrotóxicos, estão os fungos, que devido a fatores ambientais e sanitários encontram em alimentos desde o campo até a comercialização, uma fonte rica de nutrientes para se desenvolver. Estes se desenvolvem de forma rápida e com isso podem interferir no bem-estar humano, sendo então denominados pragas (Braibante e Zappe, 2012).

Hoje, diversas combinações de práticas culturais, fungicidas e bactericidas são utilizadas no controle de doenças, muitos destes ainda utilizam em suas fórmulas metais pesados, que podem trazer sérios danos ao consumidor e ao meio ambiente (Puruch et al., 2018).

Diferentes compostos orgânicos oriundos do metabolismo secundário de bactérias são utilizados em diversos processos industriais e agrícolas (Turatto, 2015). Nos últimos anos vem sendo avaliada a atuação de diferentes espécies do gênero *Bacillus* contra microrganismos fitopatogênicos, incluindo bactérias e fungos que causam danos econômicos em diversos setores do agronegócio, viabilizando assim o uso de práticas mais sustentáveis através do controle biológico.

Em estudos realizados por diversos autores, as bactérias do gênero *Bacillus* surgiram como grandes promotoras do crescimento de plantas, além de atuar também no biocontrole de certos microrganismos, dentre as mais estudadas está a *B. Amyloliqnefaciens*. Elas atuam através de mecanismos diretos e indiretos, como na produção de fitormônios, lipopeptídeos, sintetizando enzimas e compostos antifúngicos, e na aquisição de nutrientes como o fósforo e nitrogênio, potencializando o crescimento de algumas plantas (Martinez-Hidalgo et al., 2015; Farzand et al., 2020; Wang et al., 2020). O potencial de biocontrole dos fungos por meio da ação de bactérias fitopatogênicas vem atraindo o interesse de diversos pesquisadores da área, mostrando-se uma alternativa ambientalmente benéfica (Duraijaj et al., 2018). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi reunir dados sobre o papel da espécie *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos.

Foi tratada nesta revisão, de maneira exploratória, a literatura contida nas bases de dados virtuais: SciELO, Scopus e Periódicos CAPES. Tais publicações foram buscadas dos anos 2005 a 2020. Os indexadores utilizados na pesquisa foram “*amyloliqnefaciens*” e “fung*”. Tal pesquisa resultou em 36 trabalhos, sendo 22 deles considerados elegíveis para o estudo. A busca foi feita em trabalhos nacionais e internacionais buscando-se resultados, técnicas e informações importantes que estivessem conectadas com o tema desta revisão.

RESULTADOS

Pertencente ao gênero *Bacillus*, a *Bacillus amyloliquefaciens* é uma espécie bacteriana de vida livre no solo, conhecida por ser promotora do crescimento de diversas espécies de plantas. Sua nomenclatura foi dada pelo japonês J. Fukumoto, devido a sua capacidade de realizar a liquefação do amido (amylo + lique + faciens). São bactérias aeróbias, gram-positivas e formadoras de endósporos, o que as permite sobreviver por um longo período (Fan et al., 2012; Torres et al., 2016; Wu et al., 2019). Em função de sua capacidade de se adaptar e sobreviver nos solos, já foi avaliada a sobrevivência de seus esporos em temperaturas de até 120°C, sendo a temperatura ótima de crescimento girando em torno de 37°C para algumas cepas (Margosch et al., 2006; Ahlem et al., 2012; Gotor-Vila et al., 2017).

Dentre os compostos que levaram a *B. amyloliquefaciens* a um crescente interesse científico, estão seus metabólitos secundários. Os compostos antifúngicos produzidos pela *B. amyloliquefaciens* encontrados na literatura avaliada são: Iturina, Fengicina, Surfactina, Bacilomicina, Bacilobactina e Plipastatina. Chamados de lipopeptídeos (LPs), estes compostos são uma classe de surfactantes microbiológicos capazes de agir como antibióticos e até mesmo como inibidores de certas enzimas (Kim et al., 2017). Sua estrutura característica consiste em um ácido graxo, combinado com uma porção de aminoácidos. Devido à ação antibiótica, diversos estudos vêm buscando descobrir novos compostos. O biosurfactante mais eficaz conhecido é a Surfactina, produzida principalmente pela *B. subtilis*, capaz de hidrolisar lipídeos nas membranas celulares de outros microrganismos (Fernandes et al., 2007; Farzand et al., 2020).

Diferentes mecanismos de ação são utilizados pelos LPs em suas ações antifúngicas dependendo do patógeno que esteja inibindo, como é mostrado em ordem cronológica de publicação na Tabela 1.

Tabela 1. Informações relacionadas ao mecanismo de ação de diferentes cepas da bactéria *B. amyloliquefaciens* e seus patógenos alvo.

Espécie/ Cepa	Lipopeptídeos Envolvidos	Modo de Ação	Patógeno Alvo	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - 7079	Além da Surfactina, Iturina e Fengicina, também avaliou as enzimas hidrolíticas extracelulares de protease e quitinases.	Estabeleceu um escudo de proteção ao redor da raiz da planta.	<i>Phytophthora capsici</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> .	Chung e Kim, 2005.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -UCMB-5113 / UCMB-5036	Produção de ácido salicílico	Mata ou previne a germinação dos esporos dos fungos. Induz a planta a ativar sua resistência sistêmica induzida.	<i>Alternaria brassicae</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Leptosphaeria maculans</i> ; <i>Verticillium longisporum</i> .	Danielsson et al., 2006.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - CCM1 1051	Iturina.	Resultados demonstraram que a inibição ocorreu de forma mais acentuada nos testes onde houve maior formação de esporos, sugerindo que a produção de LPs está diretamente relacionada com a esporulação da bactéria.	<i>Trichoderma harzianum</i> .	Caldeira et al., 2007.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - CGMCC 5569	Fengicina, surfactina e bacilomicina.	Não especificado.	<i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i> , <i>Lasiodiplodia crassispora</i> e <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Yuan et al., 2012.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - SH-B10	C16 Fengicina A e um Derivativo contendo Ácido Aminobutírico	Alteram a estrutura e permeabilidade da membrana celular.	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumis melo</i> L.e <i>F. graminearum</i> f. sp. <i>zea mays</i> L.	Chen et al., 2013.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -CNU114001.	Iturina	O mecanismo de ação é baseado na perturbação osmótica devido à formação de poros condutores de íons.	<i>Alternaria panax</i> , <i>Botrytis cinera</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Pyricularia grisea</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ji et al., 2013.

Espécie/ Cepa	Lipopeptídeos Envolvidos	Modo de Ação	Patógeno Alvo	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -SQR9	Bacilomicina D, Fengicina, Surfactina e Bacilobactina.	A atividade antifúngica foi induzida com a presença do patógeno. Em alguns fungos houve maior produção de determinado LP do que em outros. Algumas cepas deficientes em genes responsáveis por produzir os LP's foram também testadas, não apresentando ação antifúngica.	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Fusarium oxysporum f. sp. Cucumerinum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Phytophthora parasitica var. nicotianae</i>	Li et al., 2014.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - FZB42	Surfactina, Iturina E Fengicina	Ruptura da integridade da membrana, levando à lise de vários estágios de vida de fungos.	<i>Cladosporium cucumerinum</i> ; <i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Pythium aphanidermatum</i>	Cawoy et al., 2014.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - S76-3	Iturina A e Pliplastatina A	As análises revelaram mudanças morfológicas graves nos conídios e distorções substanciais nas hifas FG tratadas com os LPs. A iturina A causou vazamento de conteúdo celular fúngico e a plipastatina A causou a vascularização.	<i>Fusarium graminearum</i>	Gong et al., 2015.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -IUMC7	Os compostos que atuam na inibição não foram identificados.	Competição de nutrientes, ligação do antagonista ao patógeno, resistência induzida e parasitismo direto.	<i>Fusariumoxysporum f. sp. Lycopersici</i>	Sotoyama et al., 2016.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - PGPBacCA1	Surfactina, iturina e fengicina.	Com o auxílio das propriedades surfactantes da surfactina, o potencial antifúngico dos outros LPs é potencializado. Alterando a estrutura e permeabilidade das membranas.	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Torres et al., 2016.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - BLB369	Iturina e surfactina.	Os LPs são resistentes à temperatura, interação entre si, desintegrando a parede celular do fungo, levando-o à morte.	<i>F. graminearum</i> -ISPAVE 271, <i>F. oxysporum</i> -CTM10402, <i>F. culmorum</i> -ISPAVE 21w, <i>Alternaria alternata</i> -CTM10230, <i>Rhizoctonia oryzae</i> , e <i>Aspergillus niger</i> .	Zalila-kolsi et al., 2016.

Espécie/ Cepa	Lipopeptídeos Envolvidos	Modo de Ação	Patógeno Alvo	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - FZB42	Bacilomicina D	Mudanças morfológicas na membrana plasmática e na parede celular de hifas. A bacilomicina D induziu o acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs), causando a morte em hifas e conídios.	<i>Fusarium graminearum</i>	Gu et al., 2017.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - JCK-12	Iturina, fengicina e surfactina.	A iturina foi responsável por inibir a produção de esporos. A fengicina ou a surfactina sozinhas não mostraram nenhuma ação inibidora de esporos. A sinergia entre as 3 mostrou um bom efeito inibitório. A provável causa é relacionada ao dano causado na parede celular do fungo, aumentando sua sensibilidade ao fungicida.	<i>Fusarium graminearum</i>	Kim et al., 2017.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - NCPSJ7	Surfactina, iturina e fengicina.	Foi observado o encolhimento e colapso das hifas do <i>F. graminearum</i> . Apareceram também fragmentos de hifas causados pela lise.	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Alternaria bokurai</i> , <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe, <i>Macrophoma kawatsuka</i> , <i>Verticillium ahliae</i> , <i>Pythium ultimum</i>	Wang et al., 2017.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - NJN-6	Iturina A, fengicina e bacilomicina (D e F).	Mostraram ter um forte efeito antagônico no crescimento de fungos patogênicos para plantas e a inibição de um amplo espectro de germinação de esporos.	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Humicola sp</i> NJR102 11, <i>Chaetomium succineum</i> , <i>Acremonium dichromosporum</i> , <i>Penicillium menonorum</i> .	Yuan et al., 2017
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - S499	Surfactina, fengicina e iturina.	Em alguns casos esteve relacionado a permeabilização de esporos, inibindo a germinação das células das hifas. A fengicina também inibiu a síntese de DNA em <i>Rhizopus stolonifer</i> em baixas concentrações.	<i>Rhizomucor variabilis</i> .	Kulimushi et al., 2017.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - S499	Surfactina, iturina e fengicina.	Tanto nos experimentos <i>in vitro</i> quanto nos <i>in vivo</i> , ocorreu a inibição do patógeno. Houve aumento também da taxa de germinação das sementes de milho.	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> e <i>Penicillium variabile</i> .	Kulimushi et al., 2018.

Espécie/ Cepa	Lipopeptídeos Envolvidos	Modo de Ação	Patógeno Alvo	Referência
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -EZ1509.	Fengicina, iturina, surfactina e bacilomicina	Encolhimento, desintegração, quebra e plasmólise das hifas do fungo. A iturina age em sinergia com a surfactina criando poros na membrana biológica, levando à ruptura e solubilização da membrana. A fengicina atua principalmente contra fungos filamentosos, causando a solubilização, criando canais condutores de íons pela membrana.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Farzand, et al., 2019.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -MBI600 (Integral® Pro)	-	-	<i>Alternaria alternata</i>	Kgatile et al., 2020.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -YTB1407	Produção de metabólito antifúngico.	O pré-tratamento com a bactéria ativou a expressão do gene responsável pela produção de ácido salicílico, induzindo a resistência sistêmica da planta de batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i> cv. Yanshu 25).	<i>Fusarium solani</i> Mart. Sacc. f. sp. McClure e <i>Ceratocystis fimbriata</i> Ell. & Halst	Wang et al., 2020.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - GGA	Bacilomicina, fengicina, e surfactina.	Apresentou alterações morfológicas nas estruturas fúngicas, como: escleródio enrugados com depressões na superfície e cascas rompidas; microconídios distorcidos e encolhidos; e hifas torcidas, enroladas e colapsadas.	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Rashad et al., 2020.

DISCUSSÃO

Mecanismos de Ação dos Lipopeptídeos

Nos estudos mais antigos, observou-se que ainda era desconhecido o mecanismo de ação empregado pelos LPs. Entendia-se que eles induziriam uma resistência sistêmica (ISR) nas plantas, para que estas pudessem se proteger contra os fitopatógenos (Chung e Kim, 2005; Danielsson et al., 2006). Isso de fato ocorre com algumas plantas, como é o caso do milho (*Zea mays*) inoculado com *Piriformospora indica*, reduzindo a susceptibilidade das plântulas à infecção por *Fusarium verticillioide* (Kumar et al., 2009). Através da ISR, quando a planta é exposta a um agente biótico (microrganismo), suas moléculas indutoras se ligam às moléculas receptoras presentes nas membranas das células vegetais, levando a planta a ativar sua resposta imune contra um patógeno (Ummara et al., 2021). Essa resposta pode ser estrutural, por exemplo, quando induz uma produção maior de lignina da parede celular, dificultando a entrada do patógeno, ou bioquímicas, pela presença de enzimas envolvidas na síntese de fenóis armazenados em vesículas (Romeiro e Garcia, 2003; Newman et al., 2013; Crouzet et al., 2020).

Iturina, Surfactina e Fengicina

Os três principais LPs produzidos pelo metabolismo secundário das bactérias do gênero *Bacillus* sp. são iturina, fengicina e surfactina. Dentre eles, a iturina se destaca, sendo um composto com excelente potencial antibiótico, apresentando um amplo espectro antifúngico.

Dentro do grupo das iturinas, incluem-se: as iturinas A, C, D e E; as bacilomicinas D, F e L e as micosubtilisina. (Barros et al., 2007; Wu et al., 2018). O mecanismo de inibição da iturina opera interagindo com os compostos de esterol nas membranas celulares dos fungos, alterando a permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a deterioração dos canais transportadores dos íons potássio e resultando em morte celular (Zhang et al., 2017). Na relação de trabalhos selecionados neste artigo de revisão, é possível confirmar este mecanismo de ação, onde a ação do LP levou à desintegração da membrana celular de hifas e conídios, abrindo canais condutores específicos de íons. (Caldeira et al., 2011; Ji et al., 2013; Gong et al., 2015; Torres et al., 2016; Zalila-Kolsi et al., 2016; Kim et al., 2017; Kulimushi et al., 2017; Wang et al., 2017; Yuan et al., 2017; Rashad et al., 2020).

Testando-se a bacilomicina-D isolada da cepa *Bacillus amyloliquefaciens* - FZB42 contra o *F. graminearum*, foi revelado que usando o LP na forma purificada houve uma melhora no desempenho com concentração inibitória de 50% de 30µg/ml. No teste removendo-se os genes produtores de fengicina e bacilomicina-D, a ação antifúngica foi nula (Gu et al., 2017).

Neste grupo de lipopeptídeos encontram-se as fengicinas A e B e as plipastatinas A e B (Yang et al., 2015). Um dos possíveis mecanismos para a atividade antifúngica da fengicina é a interação com esteroides e moléculas de fosfolipídios nas membranas, alterando a estrutura e permeabilidade da membrana celular do fungo (Chen et al., 2010; Rashad et al., 2020). A importância da membrana celular fúngica na preservação da forma e integridade celular destes microrganismos e sua composição fosfolipídica desempenham um papel crucial em suas interações com o meio e com muitas proteínas intrínsecas (transmembranar) (Athanasopoulos et al., 2020).

Através de análises microscópicas, Farzand et al. (2020) evidenciaram que a fengicina atuou principalmente contra fungos filamentosos, causando a solubilização e criando canais condutores de íons pela membrana. O ergosterol é um esterol presente na membrana plasmática de fungos. Wise et al. (2014) mostraram que a sensibilidade dos fungos à fengicina está relacionada à baixos níveis de ergosterol em sua membrana, conseguindo até mesmo inibir a produção de DNA, como no caso do fungo *Rhizopus stolonifer*. Neste sentido, qualquer perturbação na membrana leva à desordem celular, afetando o desempenho daquele microrganismo.

Os surfactantes são utilizados em diferentes processos industriais, trabalhando como, emulsificante, agente umectante ou de suspensão, dispersão de fases e lubrificantes, sendo seu maior uso concentrado nas indústrias de produtos de limpeza. São compostos orgânicos anfipáticos, ou seja, apresentam uma porção polar e outra apolar em sua molécula (Tripathy et al., 2018). A surfactina é considerada um biosurfactante por apresentar em sua molécula uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Sua família é formada pelas surfactinas A, B e C, que variam de acordo com sua composição química (Oliveira Felipe e Dias, 2017; Koim-Puchowska et al., 2019; Kotoky et al., 2020).

A surfactina também vem sendo testada como agente antibiótico, no trabalho de Plaza et al. (2013), o biosurfactante foi capaz de inibir e danificar hifas fúngicas, causando danos ao DNA, às proteínas e reduziram o antioxidante glutathiona das células do patógeno. Buscando entender os mecanismos de ação utilizados pelo composto surfactina, Jiang et al. (2016) analisaram através de um microscópio eletrônico de transmissão o efeito que a surfactina teve no crescimento do fungo *Fusarium moniliforme*, observando que nos tratamentos contendo o composto antifúngico houve a formação de vacúolos no interior das hifas causando aglomeração das organelas devido ao espaço ocupado pelos vacúolos. Além do mais, o aumento da concentração da surfactina, levou à maior indução de apoptose das hifas e esporos fúngicos (Qi et al., 2010).

Coprodução de Lipopeptídeos por *B. amyloliquefaciens*

A produção dos lipopeptídeos é em certos casos induzida pela presença do patógeno. Diante disso, alguns trabalhos investigaram a influência da espécie de fungo na produção de diferentes lipopeptídeos, como no caso da fengicina ser mais eficiente contra fungos filamentosos (Li et al., 2014; Farzand, et al., 2019). Apesar de não ter um grande potencial antifúngico como os outros lipopeptídeos, a surfactina tem a capacidade de potencializar a ação antifúngica dos demais compostos (Torres et al., 2015). O sobrenadante do caldo bacteriano fermentado da cepa *Bacillus amyloliquefaciens* - NCPSJ7 foi testado sua ação antifúngica em diferentes temperaturas e pHs. Contra o *Fusarium graminearum*, a concentração mínima fungicida foi de 31µg/ml e a faixa de temperatura tolerada pelo sobrenadante de 4 a 80°C e pH de 1 a 11, a presença do íon Na⁺ elevou sua atividade inibitória.

As análises de Cawoy et al. (2014) mostraram que as cepas bacterianas capazes de produzir as três famílias de lipopeptídeos tiveram um potencial de inibição dos fungos maior que as cepas que deixaram de produzir a iturina por exemplo. Esses mesmos autores também enfatizam que, além disso, a inibição do *F. oxysporum* dependia da presença de iturina e fengicina, enquanto a inibição do *C. cucumericum*

decorre da presença de fengicina somente. Outro ponto abordado neste trabalho foi a produção dos LPs por uma mesma cepa de *Bacillus*, quando em contato com diferentes fungos, sugerindo que a bactéria tem a capacidade de receber sinais emitidos pelo patógeno, aprimorando a produção da fengicina e da iturina.

Principais Patógenos Testados quanto à Inibição

Diversos gêneros de fungos fitopatogênicos foram utilizados nos estudos descritos neste trabalho. Dentre os mais analisados estão: *Fusarium*, *Alternaria*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* e *Penicillium*, responsáveis por grandes prejuízos econômicos causados pela perda de alimentos no setor agrícola (Oliveira et al., 2019). Estes atacam diversas partes da planta, como nas raízes no caso do *F. solani*, corrompendo o tecido interno da raiz (xilema), levando à interrupção da condução da seiva bruta para o restante da planta (Anjos et al., 2018). O caule também é uma parte da planta afetada por diferentes espécies de fitopatógenos, como a *Rhizoctonia solani* (Podridão-radicular) que ao gerar lesões no caule leva ao tombamento das plantas em estágio inicial de crescimento (Juber et al., 2016). A parte foliar da planta é fortemente afetada pela espécie fúngica *Verticillium dahliae*, que leva à necrose das folhas e consequentemente má-formação dos frutos (Díaz et al., 2019).

Devido à sua capacidade de formação de microescleródios quando se encontram em condições ambientais adversas, como baixa umidade relativa do solo. Diversas espécies de fungos sobrevivem para que ao encontrar condições ambientais favoráveis possam voltar a se desenvolver e atacar as plantas (Pagano e Dhar, 2015). Deste modo, o controle sanitário nas sementes é de extrema importância para evitar a contaminação e comprometer a germinação das sementes (Nascimento et al., 2016).

Alguns dos fungos estudados apresentaram certa resistência ao biocontrole como no caso do fungo *Pyricularia grisea* e *Pythium aphanidermatum*, no entanto, o resultado foi positivo em relação à inibição do crescimento micelial na grande maioria dos fungos analisados pelos autores (Ji et al., 2013; Cawoy et al., 2014). Utilizou-se a cepa *Bacillus amyloliquefaciens* - GGA sozinha e em consórcio com fungos micorrízicos com o objetivo de avaliar seu potencial antifúngico contra o *Sclerotium cepivorum* patógeno do alho (*Allium sativum*), alcançando 63,8% de inibição do fungo patogênico após 12 dias de crescimento (Rashad et al., 2020). Foi observado, portanto, que através dos estudos *in vitro*, a bactéria *B. amyloliquefaciens* foi capaz de produzir diversas substâncias responsáveis pela inibição de muitos microrganismos, inclusive fungos, apresentando alta atividade inibitória.

Comparativos entre Fungicidas Químicos e Biológicos

Combinações de fungicidas químicos e biológicos misturados também apresentaram resultados satisfatórios, como no estudo feito por Kim et al. (2017), onde o melhor resultado encontrado foi combinando-se o fungicida Almuri e o caldo de fermentação da *B. amyloliquefaciens*. O teste foi feito buscando avaliar a ação de quimiossensibilização da cepa bacteriana, deixando o fungo mais sensível ao efeito do fungicida químico. Outra associação que demonstrou aumento no controle do patógeno foi a utilização da *B. amyloliquefaciens* com fungos micorrízicos arbusculares (Younes et al., 2020).

As taxas de supressão da *Phytophthora capsici* e *Fusarium oxysporum* por *B. amyloliquefaciens* 7079 foram 1,5 e 2,2 vezes melhores, respectivamente, do que por três fungicidas químicos populares usados em práticas agrícolas reais. Além disso, a cepa persistiu no solo por 50 dias após aplicada a solução biológica (Chung e kim, 2005). A inibição do extrato de células bacterianas sobre o crescimento de fungos do teste na concentração acima de 20µg/mL foi significativamente superior à do fungicida comumente usados, Nystafungin, na concentração de 60µg/mL (Yuan et al., 2012). Foram testados 5 fungicidas já conhecidos no mercado e o produto comercial integral@ PRO (*B. amyloliquefaciens* MBI600). O tratamento biológico apresentou o terceiro melhor resultado em relação à aplicação do tratamento nas sementes (Kgatle et al., 2020).

Testes *in Vivo*

Além da análise em laboratório quanto à eficácia da inibição provocada pela bactéria, é necessário que haja estudos mostrando sua aplicação no campo, com o objetivo de analisar sua aplicabilidade, sobrevivência e interação com os demais microrganismos no solo. Nos estudos de Ji et al. (2013), foram realizados experimentos envolvendo o fruto pepino (*Cucumis sativus*), onde a cada 7 dias foi borrifada no próprio fruto já infectado com *Sclerotinia sclerotiorum*, a solução bacteriana diluída. Obteve-se uma redução da doença em níveis acima de 60% nas diluições de 10 e 20 vezes. Resultados semelhantes foram encontrados por Wang et al. (2020), no qual a suspensão bacteriana adicionada no solo atingiu um nível de controle de 83,33% para o *F. solani* e 49,95% para *C. fimbriata*.

O percentual de germinação das sementes inoculadas com as bactérias antagonistas de três espécies diferentes de *Bacillus* por Zalila-Kolsi et al. (2016), mostrou-se superior àquelas inoculadas somente com o fungo patógeno, estando acima de 80% de sementes germinadas. Tal resultado também é visto nos estudos de Kulimushi et al. (2018), no qual a inoculação das sementes infectadas com as bactérias aumentou a taxa de germinação das sementes de 5 a 13% dependendo do patógeno. Houve também um decréscimo de 5 a 30% na taxa de mortalidade das plantas no estágio inicial de crescimento.

As cepas *Bacillus amyloliquefaciens*-UCMB-5113/UCMB-5036 mostraram-se significativamente eficientes contra todos os patógenos testados (*Alternaria brassicae*; *Botrytis cinerea*; *Leptosphaeria maculans*; *Verticillium longisporum*). A concentração de sobrenadante para a inibição completa foi de 100µL para *Botrytis cinérea* e de 10µL para os demais patógenos, além de matar ou prevenir a germinação dos esporos dos fungos e induzir a planta a ativar sua resistência sistêmica (Danielsson et al., 2006).

A cepa *Bacillus amyloliquefaciens* - CGMCC 5569 mostrou forte atividade de controle do crescimento *in vitro* de *Lasioidiplodia rubropurpurea*, *L. crassispora* e *L. theobromae* inibindo o crescimento dos patógenos em cerca de 70,22%, 69,53% e 78,76%, respectivamente. Nos testes *in vivo* reproduzidos por Wang et al. (2020), utilizando a cepa *Bacillus amyloliquefaciens* -YTB1407 na parte aérea da planta, o controle do *F. solani* chegou a 83,33% e o controle da *C. fimbriata* foi de 49,95%.

A área de biodefensivos vem ganhando um maior enfoque nos últimos anos, principalmente devido às questões ambientais. Os estudos relacionados à *B. amyloliquefaciens* encontrados se referem tanto ao seu poder de controle de alguns fungos quanto à sua capacidade de promover o crescimento acelerado

de algumas espécies de plantas, possui também algumas vantagens como não ser susceptível à resistência pelos fungos com o passar do tempo. No que se refere ao controle biológico, diversos produtos já podem ser encontrados no mercado em escala comercial e para multiplicação OnFarm.

CONCLUSÕES

Devido aos efeitos negativos advindos dos produtos químicos agrícolas, incluindo a poluição ambiental, o manejo de doenças através do biocontrole mostra-se essencial para uma agricultura mais sustentável. Outro ponto muito discutido é em relação ao ganho para o meio ambiente, que produtos biológicos podem trazer. Tais ganhos vão desde a redução do uso de produtos químicos, até o aumento da absorção de carbono por meio dos microrganismos.

Neste trabalho foi possível observar que os estudos relacionados ao uso da bactéria *B. amyloliquefaciens* caminham de forma avançada e apresentando resultados positivos no controle de diversas espécies fitopatogênicas. Dentre as espécies fúngicas fitopatogênicas inibidas pela bactéria antagonista estão: *Alternaria alternata*; *Alternaria brassicae*; *Alternaria panax*; *Aspergillus niger*; *Botrytis cinera*; *Cladosporium cucumerinum*; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*; *Fusarium graminearum*; *Fusarium verticillioides*; *Macrophomina phaseolina*; *Penicillium digitatum*; *Rhizoctonia solani*; *Rhizoctonia oryzae*; *Sclerotium cepivorum*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Verticillium dahliae*.

Os mecanismos de ação das espécies de *B. amyloliquefaciens* avaliados estão diretamente relacionados com a produção de antibióticos lipopeptídicos. Os trabalhos identificaram os seguintes lipopeptídeos envolvidos no controle do crescimento fúngico: Bacilomicina (D e F); Bacilobactina; Fengicina; Iturina (A e E); Surfactina e Pliplastatina A. O controle destes microrganismos fitopatogênicos ocorre principalmente através do rompimento da parede celular do fungo, criando-se dutos capazes de alterar a permeabilidade da célula. Tendo em alguns casos, a atividade antifúngica e produção de lipopeptídeos induzida pelo contato com o patógeno.

REFERÊNCIAS

- AHLEM, H. et al. 2012. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. **African Journal of Biotechnology**, **11**(9):2210-2217.
- ANJOS, I. V. D. et al. 2018. Reaction of accessions of *Capsicum* spp. to the fungus *Fusarium solani*. **Summa Phytopathologica**, **44**(4):344-349.
- ATHANASOPOULOS, A. et al. 2019. Fungal plasma membrane domains. **FEMS microbiology reviews**, **43**(6):642-673.
- BANDARA, A. Y. et al. 2020. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. **PloS one**, **15**(4):e0231141.
- BARROS, F. F. C. et al. 2007. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, **30**(2):409-414.
- BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. 2012. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, **34**(1):10-1.

- CALDEIRA, A. T. et al. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051 *in vitro* activity against wood contaminant fungi. **Annals of microbiology**, 57(1):29-33.
- CAWOY, H. et al. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *B. subtilis*/*amyloliquefaciens*. **Microbial biotechnology**, 8(2):281-295.
- CHEN, L. et al. 2010. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. **Bioresource Technology**, 101(22):8822-8827.
- CHUNG, S.; KIM, S. D. 2005. Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; suppression rates are better than popular chemical fungicides. **Journal of microbiology and biotechnology**, 15(5):1011-1021.
- CROUZET, J. et al. 2020. Biosurfactants in plant protection against diseases: rhamnolipids and lipopeptides case study. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 8:1014.
- DANIELSSON, J.; REVA, O.; MEIJER, J. 2007. Protection of oilseed rape (*Brassica napus*) toward fungal pathogens by strains of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microbial ecology**, 54(1):134-140.
- DE OLIVEIRA FELIPE, L.; DE CÁSSIA DIAS, S. 2017. Surfactantes sintéticos e biosurfactantes: vantagens e desvantagens. **Quím. nova esc**, 39(3):228-236.
- DÍAZ, M. D. M. G. et al. 2019. Soil biosolarization for *Verticillium dahliae* and *Rhizoctonia solani* control in artichoke crops in southeastern Spain. **Spanish journal of agricultural research**, 17(1):19.
- FAN, B. et al. 2012. Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. **The Journal of Microbiology**, 50(1):38-44.
- FARZAND, A. et al. 2020. Transcriptional profiling of diffusible lipopeptides and fungal virulence genes during *Bacillus amyloliquefaciens* EZ1509-mediated suppression of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, 110(2):317-326.
- FERNANDES, P. A. V. et al. 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38(4):704-709.
- GONG, A. D. et al. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. **PLoS one**, 10(2): e0116871.
- GOTOR-VILA, A. et al. 2017. Biological characterization of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: the effect of temperature, pH and water activity on growth, susceptibility to antibiotics and detection of enterotoxin genes. **Current microbiology**, 74(9):1089-1099.
- GU, Q. et al. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Appl Environ Microbiol**, 83(19):e01075-17.
- JL, S. H. et al. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, 41(4):234-242.
- JIANG, J. et al. 2016. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. **BMC microbiology**, 16(1):31.
- JUBER, K. S.; AL-JUBOORY, H. H.; AL-JUBOORY, S. B. 2016. Identification and control of strawberry root and stalk rot in Iraq. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, 2(2):54-63.
- KGATLE, M. G. et al. 2020. Control of *Alternaria leaf blight* caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, 132: 105146.
- KIM, K. et al. 2017. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain JCK-12. **Frontiers in plant science**, 8.
- KOIM-PUCHOWSKA, B. et al. 2019 Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surface-active compounds. **PLoS ONE**, 14(11):e0225108.

- KOTOKY, R.; PANDEY, P. 2020. Rhizosphere mediated biodegradation of benzo (A) pyrene by surfactin producing soil bacilli applied through *Melia azedarach* rhizosphere. **International journal of phytoremediation**, 22(4):363-72.
- KULIMUSHI, P. Z. et al. 2017. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. **Frontiers in microbiology**, 8:850.
- _____. 2018. Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(30):29808-29821.
- KUMAR, M. et al. 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. **Microbiology**, 155(3):780-790.
- LI, B. et al. 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. **Frontiers in microbiology**, 5:636.
- MARGOSCH, D. et al. 2006. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. **Applied and environmental microbiology**, 72(5):3476-3481.
- MARTÍNEZ-HIDALGO, P.; GARCÍA, J. M.; POZO, M. J. 2015. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. **Frontiers in microbiology**, 6:922.
- NASCIMENTO, S. R. C. et al. 2016. Sobrevivência de estrutura de resistência de *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em solo tratado biologicamente. **Revista Agro@mbiente On-line**, 10(1):50-56.
- NEWMAN, M. A. et al. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in plant science**, 4:139.
- OLIVEIRA, L. A. et al. 2019. Fungos de um nicho ancestral: fungos fitopatogênicos em pteridófitas no Brasil. **FUNGOS**, 75-86
- PAGANO, M. C.; DHAR, P. P. 2015. Fungal pigments: an overview. **Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments**, 13:173-9.
- PLAZA, G. A. et al. 2013. Antifungal and antibacterial properties of surfactin isolated from *Bacillus subtilis* growing on molasses. **African Journal of Microbiology Research**, 7(25):3165-3170.
- PERUCH, L. A. M., COLARICCIO A., e BATISTA, D. C. 2018. Controle de doenças do maracujazeiro: situação atual e perspectivas. **Agropecuária Catarinense**, 31(1): 37-40.
- QI, G. et al. 2010. Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway. **Peptides**, 31(11):1978-1986.
- RASHAD, Y. M. et al. 2020. Synergy between endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* GGA and arbuscular mycorrhizal fungi induces plant defense responses against white rot of garlic and improves host plant growth. **Phytopathologia Mediterranea**, 59(1):169-186.
- ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. 2003. Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 11(1):195-228.
- SOTOYAMA, K.; AKUTSU, K.; NAKAJIMA, M. 2016. Biological control of *Fusarium* wilt by *Bacillus amyloliquefaciens* IUMC7 isolated from mushroom compost. **Journal of General Plant Pathology**, 82(2):105-109.
- TORRES, M. J. et al. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological research**, 182:31-39.
- TRIPATHY, D. B. et al. 2018. Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: a review. **Comptes Rendus Chimie**, 21(2):112-130.
- TURATTO, M. F. 2015. Potencial antagônico de *Pseudomonas* do grupo fluorescente isolada no planalto catarinense no controle de *Ditylenchus* spp. e *Meloidogyne javanica*. Monografia - Universidade Federal de Santa Catarina, 28p.

- UMMARA, U. et al. 2022. Induced systemic tolerance mediated by plant-microbe interaction in maize (*Zea mays* L.) plants under hydrocarbon contamination, **Chemosphere**, **290**:133327.
- WANG, C. J. et al. 2020. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 elicits resistance against two fungal pathogens in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Journal of Plant Physiology**, **253**:153260.
- WANG, J. et al. 2017. Purification and characterisation of a fungicidal peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7. **Czech Journal of Food Sciences**, **35**(2):113-121.
- WISE, C. et al. 2014. Cellular lipid composition affects sensitivity of plant pathogens to fengycin, an antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* strain CU12. **Phytopathology**, **104**:1036–1041.
- WU, J. Y. et al. 2018. Kinetic analysis on precursors for iturin, a production from *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1. **Journal of bioscience and bioengineering**, **126**(5):630-635.
- YANG, H. et al. 2015. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, **407**(9):2529-2542.
- YUAN, B. et al. 2012. Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 associated with *Ginkgo biloba* and identification of its active components. **Bioresource Technology**, **114**:536-541.
- YUAN, J. et al. 2017. Lipopeptides produced by *B. amyloliquefaciens* NJN-6 altered the soil fungal community and non-ribosomal peptides genes harboring microbial community. **Applied Soil Ecology**, **117**:96-105.
- ZALILA-KOLSI, I. et al. 2016. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). **Microbiological research**, **192**:148-158.
- ZHANG, J. H. et al. 2017. Anti-fungal activity, mechanism studies on α -Phellandrene and Nonanal against *Penicillium cyclopium*. **Botanical studies**, **58**(1):1-9.

Submetido em: 11.08.2021

Aceito em: 03.04.2022