



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA  
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI  
RESTRIÇÃO DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL  
2023**



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE SOLO CONTAMINADOS COM  
COBRE E SEU POTENCIAL COMO BIOAGENTE.**

**Giovana Lara Debastiani**

**Caxias do Sul**

**2023**



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL  
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE SOLO CONTAMINADOS COM  
COBRE E SEU POTENCIAL COMO BIOAGENTE.**

**Trabalho apresentado à Universidade  
de Caxias do Sul para obter o  
Mestrado Acadêmico em  
Biotecnologia.**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Joséli Schwambach

CAXIAS DO SUL

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

D286s Debastiani, Giovana Lara

Seleção de microrganismos de solo contaminados com cobre e seu potencial como bioagente [recurso eletrônico] / Giovana Lara Debastiani. – 2023.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

Orientação: Joséli Schwambach.

Coorientação: Camille Eichelberger Granada.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Antibiose. 2. Bacillus subtilis. 3. Biotecnologia. 4. Videira. 5. Cobre. I. Schwambach, Joséli, orient. II. Granada, Camille Eichelberger, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 579.264

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**Giovana Lara Debastiani**

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE SOLO CONTAMINADOS COM  
COBRE E SEU POTENCIAL COMO BIOAGENTE.**

**Trabalho apresentado à Universidade  
de Caxias do Sul para obter o  
Mestrado Acadêmico em  
Biotecnologia.**

Aprovado em: 28/09/2023

**COMISSÃO AVALIADORA:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Joséli Schwambach - UCS (orientadora)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Camille Eichelberger Granada – UNIVATES (coorientadora)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Pereira Passaglia - UFRGS

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Evelise Bach - UFRGS

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Longaray Delamare - UCS

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Instituto de Biotecnologia e a Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES).

Ao Capes/Prosup pela bolsa de Mestrado concedida.

As Professoras Dr<sup>a</sup>. Joséli Schwambach e Dr<sup>a</sup>. Camille Eichelberger Granada pela orientação e coorientação, respectivamente, no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas dos Laboratórios de Controle Biológico de Doenças de Plantas, Agricultura Orgânica, Microbiologia Aplicada e Laboratório de Química e Fertilidade do Solo da UCS, ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UNIVATES pela colaboração, desenvolvimento de experimentos em parceria, disponibilidade inestimável na execução dos protocolos laboratoriais, ensinamentos, amizades e momentos de descontração.

Aos membros da banca de acompanhamento, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Longaray Delamare e ao Prof. Dr. Gabriel Pauletti pelas correções e complementações no trabalho.

A coordenação do PPGBio e equipe por todo apoio administrativo.

À minha família, marido, amigas e colegas, pelo incentivo, amor e por estarem sempre comigo.

**MUITO OBRIGADA!**

“A natureza nos surpreende em seus pequenos e generosos detalhes.”

Albino César Moraes da Rosa

Ánanda - Chela Swami

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO .....	10
	1.1 Dados preliminares.....	12
2.	OBJETIVOS .....	13
	2.1. Objetivo Geral .....	13
	2.2. Objetivos Específicos .....	13
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
	3.1. A viticultura .....	14
	3.2. A Videira no Rio Grande do Sul .....	14
	3.3. Utilização de fungicidas cúpricos e a contaminação do solo .....	15
	3.4. Comunidades microbianas do solo.....	17
	3.5. Microrganismos promotores de crescimento vegetal .....	19
	3.6. <i>Bacillus</i> sp. como promotor de crescimento.....	22
	3.7. Benefícios dos microrganismos em solos contaminados com excesso de Cobre .....	24
	3.8. Antagonismo entre microrganismos.....	26
	3.9. Doenças microbianas de videira.....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
	Manuscrito 1: <i>Bacillus</i> sp. S26 inoculation alleviates abiotic and biotic stresses in vine cuttings .....	30
	Manuscrito 2: Antagonismo de S26 contra fitopatógenos de videira.....	42
5.	CONCLUSÃO GERAL .....	48
6.	PERSPECTIVAS .....	50
7.	BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	51



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Physico chemical and nutrient analysis of soils from long time of conventional crop (LC), short time conventional crop for (SC), and long time of organic crop (LO).....	31
<b>Tabela 2:</b> Growth promotion characteristics and identification of 14 bacterial strains isolated from Cu contaminated soils.....	35
<b>Tabela 3:</b> Effects of application of <i>Bacillus</i> sp. S26 on Isabella grape berries variety inoculated with <i>Colletotrichum acutatum</i> . ....	36
<b>Tabela 4:</b> Parameters of grapevine evaluated after 120 days of growth in the four evaluated treatments. ....	37

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Caracterização das amostras NC, VC e VO, quando manejo, coordenadas geográficas, cultivar, data da coleta e dados da análise de solo .....	13
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito 1

- Figura 1:** Relative abundance of taxa detected in soil samples from: Long time of conventional crop (LC), short time conventional crop for (SC), and long time of organic crop (LO).....32
- Figura 2:** Canonical correspondence analysis among the ten microbial genus that contributed most to dissimilarities and the ten soil parameters (Organic matter [OM], clay, pH, copper [Cu], phosphorous [P], potassium [K], zinc [Zn], magnesium [Mg], calcium [Ca], and sulfur [S]) from long time of conventional crop (LC), short time conventional crop for (SC), and long time of organic crop (LO)..... 33
- Figura 3:** Pearson's correlation analysis ( $p < 0.05$ ) among soil parameters (Zn, Cu, K, P, S, MO, Mg, Ca, clay and pH) and 49 prokaryotic OTUs that contributed most for total dissimilarity. .... 34
- Figura 4:** Effect of antagonism of bacterial strains on the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (1), *C. fructicola* (2) and *C. acutatum* (3) after 14 days of inoculation. Treatments: Control (A), bacterial isolates: S13 (B), S19 (C), S20 (D), S22 (E), S24 (F), S25 (G) e S26 (H). .... 36
- Figura 5:** Effect on the vegetative growth of micropropagated and acclimatized grapevine of cultivar Isabel at 60 days inoculated with *Bacillus* sp. S26 by drenching on the soil.... 36
- Figura 6:** Principal component analysis from growth parameter evaluated in grapevine (number of leaves, root and shoot length and dry matter) in the four evaluated treatments: control= ideal growth condition; S26 = ideal growth condition + *Bacillus* sp. S26 inoculation; Cu + S26 = Cu contaminated substrate + *Bacillus* sp. S26 inoculation; Cu = Cu contaminated substrate + sterile water. .... 37

## Manuscrito 2

- Figura 1:** Representação da disposição dos inóculos antagônicos entre *Bacillus* sp. e fungo fitopatogênico de videira na placa de petry. ....41
- Figura 2:** Inibição do crescimento *in vitro* do fungo fitopatogênico *Fusarium venenatum* pelo *Bacillus* sp. ao longo de 10 dias. Médias seguidas de asterisco na coluna diferem estatisticamente do controle.....42
- Figura 3:** Inibição do crescimento *in vitro* do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* pelo *Bacillus* sp. ao longo de 10 dias. Médias seguidas de asterisco na coluna diferem estatisticamente do controle.....43
- Figura 4:** Inibição do crescimento *in vitro* do fungo fitopatogênico *Botryosphaeria dothidea* pelo *Bacillus* sp. ao longo de 10 dias. Médias seguidas de asterisco na coluna diferem estatisticamente do controle.....43

## RESUMO

A cultura da videira, que é o principal e mais antigo cultivo da Serra Gaúcha está sob condições climáticas que favorecem o aparecimento de doenças de plantas, sendo necessária a aplicação de fungicidas. Os mais utilizados, nos vinhedos, são a base de cobre e em função do longo tempo de aplicações, solos contaminados por excesso deste elemento já são uma realidade no Sul do Brasil. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar a diversidade das comunidades procarióticas associadas a solos de vinhedos com alta concentração de cobre, posteriormente isolar e selecionar microrganismos com potencial promoção de crescimento vegetal e controle de fitopatógenos por antagonismo. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Controle Biológico de Doenças em Plantas da Universidade de Caxias do Sul e de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade do Vale do Taquari. Um total de três amostras de solo foram coletadas de solos vitícolas contaminados por excesso de cobre, nomeados velho orgânico (VO), velho convencional (VC) e novo convencional (NC). Parte do solo foi destinada para identificação do gênero microbiano utilizando o seqüenciamento da região 16S do rRNA e parte foi caracterizado através de análise química. Em termos de diversidade genética microbiana foram identificados 35 filos, onde o mais representativo com 15,24% de dissimilaridade total das amostras foi atribuído ao filo Proteobacteria, com aproximadamente 40% de representatividade. Os filos mais afetados pela contaminação por Cobre foram Rokubacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia e Latescibacteria. O isolamento bacteriano resultou em 14 isolados, que produziram Compostos Indólicos (IC), destacando-se como os maiores produtores as linhagens S20 e S26 e também podem produzir sideróforos, com ênfase para as cepas S19 e S26. Isolada do solo VO, a bactéria *Bacillus* sp. S26, *in vitro*, apresentou maior potencial no teste de antagonismo com os fitopatógenos *Fusarium venenatum*, *Botryosphaeria dothidea* e *Botrytis cinerea* a bactéria *Bacillus* sp. S26 inibiu o crescimento dos três, sendo que o mais expressivo foi observado no controle do *Botrytis cinerea*. A atividade antagonista *in vitro* contra *Colletotrichum* spp. identificou algumas cepas bacterianas que inibiram o crescimento dos fitopatógenos, sendo a cepa bacteriana *Bacillus* sp. S26 escolhida para o experimento de antagonismo em bagas de uva inoculadas com *Colletotrichum acutatum*, apresentando no tratamento preventivo redução de 3,5 vezes na incidência e também de inoculação em plantas de videira propagadas pelos métodos de estaquia e micropropagação. O primeiro método apresentou maior peso seco da parte aérea e no segundo auxiliou na resistência das plantas em solos contaminados com Cu, mas quando as plantas cresceram sem estresse, nenhum efeito de promoção de crescimento foi identificado. Esses dados mostraram que o *Bacillus* sp. S26 apresenta potencial para o desenvolvimento de um bioproduto inoculante redutor dos sintomas de estresses bióticos e abióticos na videira.

**Palavras-chave:** Antagonismo, *Bacillus* sp., Cobre, Caracterização Microbiana, Promoção de Crescimento Vegetal, Videira.

## ABSTRACT

### SELECTION OF SOIL MICROORGANISMS CONTAMINATED WITH COPPER AND THEIR POTENTIAL AS BIOAGENT.

The climatic conditions of the southern region of Brazil favor the appearance of plant diseases, requiring the application of fungicides, where the most commonly used are copper-based. Due to the long period of use, soils contaminated by excess of this element are already a reality, especially in vine cultivation, the principal and oldest crop in Serra Gaúcha. Therefore, this work aimed to identify the diversity of prokaryotic communities associated with vineyard soils with a high concentration of copper, subsequently isolating and selecting microorganisms with potential promotion of plant growth and control of phytopathogens through antagonism. The experiments were conducted in the Laboratory of Biological Control of Plant Diseases at the University of Caxias do Sul and Microbiology and Molecular Biology at the University of Vale do Taquari. A total of three soil samples were collected from viticultural soils contaminated by excess copper, named old organic (VO), old conventional (VC), and new conventional (NC), where part of the soil was intended for identification of the microbial genus using sequencing of the 16S region of rRNA. Part of it was characterized through chemical analysis. Regarding microbial genetic diversity, 35 phyla were identified, where the most representative, with 15.24% of total sample dissimilarity, was attributed to the phylum Proteobacteria, with approximately 40% representation. The phyla most affected by Copper contamination were Rokubacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, and Latescibacteria. Bacterial isolation resulted in 14 isolates, which produced Indolic Compounds (IC), with strains S20 and S26 being the biggest producers and can also produce siderophores, emphasizing strains S19 and S26. The bacteria *Bacillus* sp. S26, isolated from VO soil, showed more significant potential in the *in vitro* antagonism test with the phytopathogens *Fusarium venenatum*, *Botryosphaeria dothidea*, and *Botrytis cinerea* and the bacteria *Bacillus* sp. S26 inhibited the growth of all three, the most significant being observed in the control of *Botrytis cinerea*. The *in vitro* antagonistic activity against *Colletotrichum* spp. identified some bacterial strains that inhibited the growth of phytopathogens, the bacterial strain being *Bacillus* sp. S26 chosen for the antagonism experiment in grape berries inoculated with *Colletotrichum acutatum*, presenting a 3.5-fold reduction in incidence in the preventive treatment and also in inoculation in vine plants propagated by cutting and micropropagation methods, wherein the first gave greater weight dryness of the aerial part and in the second helped in the resistance of plants in Cu-contaminated soils, but when the plants grew without stress, no growth-promoting effect was identified. These data showed that *Bacillus* sp. S26 has the potential for the development of an inoculant bioproduct that reduces the symptoms of biotic and abiotic stresses in grapevines.

**Keywords:** Antagonism, *Bacillus* sp., Copper, Microbial Characterization, Plant Growth Promotion, Grapevine.