



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

**CAXIAS DO SUL  
2024**



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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFORMULAÇÕES CONTENDO  
ENDÓSPOROS DE *Bacillus velezensis* S26  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS  
E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

**Alessandra Russi**

**CAXIAS DO SUL  
2024**

**Alessandra Russi**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFORMULAÇÕES CONTENDO  
ENDÓSPOROS DE *Bacillus velezensis* S26  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E  
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Joséli Schwambach

Co-orientadora: Profa. Dra. Camille Eichelberger Granada

CAXIAS DO SUL  
2024

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

R969d Russi, Alessandra

Desenvolvimento de bioformulações contendo endósporos de *Bacillus velezensis* S26 para controle biológico de doenças e promoção do crescimento vegetal [recurso eletrônico] / Alessandra Russi. – 2024.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Joséli Schwambach.

Coorientação: Camille Eichelberger Granada.

Modo de acesso: World Wide Web

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

1. Plantas - Doenças e pragas - Controle. 2. Agricultura sustentável. 3. Pragas - Controle biológico. 4. Antracnose. I. Schwambach, Joséli, orient. II. Granada, Camille Eichelberger, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 632.93

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**Alessandra Russi**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOFORMULAÇÕES CONTENDO  
ENDÓSPOROS DE *Bacillus velezensis* S26  
PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E  
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2024.

**Banca Examinadora**

---

Dra. Joséli Schwambach

Universidade de Caxias do Sul

---

Dra. Marli Camassola

Universidade de Caxias do Sul

---

Dr. Eduardo Alves

Universidade Federal de Lavras

---

Dra. Marisa Vieira de Queiroz

Universidade Federal de Viçosa

CAXIAS DO SUL  
2024

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Morangueiro.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Videira .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Doenças pós-colheita .....</b>	<b>19</b>
3.3.1 Podridão cinzenta .....	19
3.3.2 Antracnose, flor-preta do morangueiro e podridão da uva madura .....	20
<b>3.4 Pé-preto da videira .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Solos contaminados com cobre e indução de estresse em videira .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 <i>Bacillus</i> spp. como agentes de promoção de crescimento e biocontrole ....</b>	<b>25</b>
3.6.1 Esporulação em bactérias do gênero <i>Bacillus</i> .....	30
3.6.2 Fatores envolvidos na esporulação bacteriana.....	31
<b>3.7 Bioformulações .....</b>	<b>33</b>
3.7.1 Bioformulações secas .....	35
3.7.2 Bioformulações líquidas .....	39
3.7.3 Reaproveitamento de resíduos para elaboração de bioformulações .....	40
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Bacterial agents for controlling anthracnose and soft rot in strawberries: 59present status and perspectives .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Optimization of <i>Bacillus velezensis</i> S26 sporulation for enhanced biocontrol</b>	

of gray mold and anthracnose in postharvest strawberries .....	94
4.3 Suppression of <i>Colletotrichum</i> spp. on grape berries, vine leaves, and plants using <i>Bacillus velezensis</i> S26 endospores .....	124
4.4 Antagonistic potential of <i>Bacillus velezensis</i> S26 endospores against gray mold in grapevines.....	142
4.5 Innovative formulations enriched with <i>Bacillus velezensis</i> S26 endospores using whey and composting leachate to enhance plant growth and mitigate strawberry diseases .....	167
4.6 <i>Bacillus velezensis</i> S26 - loaded biochar boosts plant growth, alleviates copper stress and suppresses black foot disease in SO4 vine rootstock.....	191
<b>5 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>219</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>226</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>228</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>229</b>

## LISTA DE SIGLAS

ADP	Ácido dipicolínico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BAP	<i>6-benzyl aminopurine</i>
BC	<i>Bacterial cells</i>
BCA	<i>Biological control agent</i>
BE	<i>Bacterial endospores</i>
BF	<i>Bioformulation</i>
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
CB	<i>Culture broth</i>
CBB	<i>Composted bagasse biochar</i>
CFS	<i>Cell-free supernatant</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CMC	<i>Carboxymethylcellulose</i>
COD	<i>Chemical oxygen demand</i>
CTC	Capacidade de troca catiônica
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DI	<i>Disease incidence</i>
DQO	Demanda química de oxigênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
DS	<i>Disease severity</i>
DSI	<i>Disease severity index</i>
END	Endósporos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBB	<i>Fresh bagasse biochar</i>
FI	<i>Fresh inoculant</i>
FM	<i>Fresh mass</i>
FS	<i>Foliar spraying</i>
GTP	Trifosfato de guanósina
LB	Luria-Bertani
MGI	<i>Mycelial growth rate</i>
MS	Murashige and Skoog



NAA	<i><math>\alpha</math>-naphthalene acetic acid</i>
NRPS	<i>Nonribosomal peptide synthetases</i>
ODS	Objetivo do Desenvolvimento Sustentável
OIV	<i>International Organisation of Vine and Wine</i>
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PGPB	<i>Plant growth-promoting bacteria</i>
PI	<i>Percentage of inhibition</i>
PKS	<i>Polyketide synthetases</i>
PM	<i>Plant mortality</i>
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
SASP	<i>Small acid soluble proteins</i>
SD	<i>Soil drenching</i>
SI	<i>Stored inoculant</i>
TSS	<i>Total soluble solids</i>
TTA	<i>Total titratable acidity</i>
UN	<i>United Nations</i>
VOC	<i>Volatile organic compounds</i>
WP	<i>Wettable powder</i>
YPG	<i>Yeast extract peptone and glucose</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do excesso e da deficiência de cobre em plantas.....	24
Figura 2. Etapas da esporulação em <i>Bacillus</i> spp.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparativo entre os fungos <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>C. acutatum</i> .....	21
Tabela 2. Principais compostos antimicrobianos sintetizados por <i>Bacillus</i> spp. e suas respectivas propriedades.....	27
Tabela 3. Principais classes de aditivos e exemplos.....	34
Tabela 4. Principais técnicas empregadas na termodecomposição da biomassa.....	38

## RESUMO

Os bioinsumos têm ganhado destaque em resposta aos efeitos prejudiciais ocasionados pelo uso excessivo de fertilizantes químicos e pesticidas ao meio ambiente e à saúde humana. Nesse contexto, o gênero *Bacillus* é constituído por bactérias Gram-positivas, formadoras de endósporos e com ação antagonística contra vários fitopatógenos. Essas bactérias também atuam estimulando o desenvolvimento vegetal e promovendo a indução de mecanismos de resistência em plantas. Conseqüentemente, o emprego desses micro-organismos, na forma de endósporos, pode contribuir para prolongar a estabilidade e a vida de prateleira de bioformulações. O presente estudo teve como objetivo determinar o potencial inibitório de suspensões de endósporos de *Bacillus velezensis* S26 no controle da podridão cinzenta causada por *Botrytis* spp., da antracnose ocasionada por *Colletotrichum* spp. e do pé-preto, cujo agente causal inclui o fungo *Dactylonectria macrodidyma*. Somado a isso, buscou-se verificar a ação de *B. velezensis* S26 na promoção do crescimento em morangueiros e videiras, bem como seu emprego na elaboração de formulações líquidas e secas usando subprodutos agroindustriais. Inicialmente, os ensaios foram conduzidos visando promover a esporulação bacteriana, em frascos de cultivo mantidos sob agitação. Posteriormente, avaliou-se o potencial antagonístico das suspensões de endósporos *B. velezensis* S26 contra isolados de *Botrytis* spp. e *Colletotrichum* spp., tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os ensaios *in vivo* foram realizados em frutos e plantas de videira e morangueiro sob condições ambientais controladas. Em seguida, foram elaboradas quatro bioformulações constituídas por lixiviado da compostagem de bagaço de uva e soro de leite, isoladamente ou em combinação. A eficácia dessas formulações foi determinada tanto em condições controladas quanto em uma estufa comercial de morangos. De forma similar, foi desenvolvida uma formulação seca a partir de biochares provenientes da pirólise do bagaço de uva fresco e do bagaço de uva compostado. O potencial de promoção do crescimento dessas formulações foi testado no porta-enxerto de videira SO4 (*Vitis berlandieri* × *V. riparia*), cultivado em substrato convencional e substrato contendo altos níveis de cobre. Também, examinou-se o efeito desses biochares associados com endósporos *B. velezensis* S26 na supressão do pé-preto da videira. Os resultados demonstraram *B. velezensis* S26 apresenta capacidade de controlar, de forma eficaz, a antracnose e a podridão cinzenta em morangueiros e videiras. Essa atividade inibitória foi mantida após seis meses de armazenamento. Além disso, os ensaios em frascos de cultivo e biorreatores possibilitaram induzir a esporulação de *B. velezensis* S26, utilizando lixiviado de compostagem e soro como meio de cultura. O emprego dessas formulações líquidas contribuiu para a promoção do crescimento de morangueiros micropropagados, bem como para o biocontrole de podridões de frutos em uma estufa comercial de morangos, com um desempenho similar ao bioproduto Duravel WP®. Finalmente, os tratamentos utilizando biochar enriquecido com endósporos de *B. velezensis* S26 contribuíram para minimizar o estresse ocasionado pelo excesso de cobre no solo, aumentar a biomassa de plantas de SO4 micropropagadas e controlar o pé-preto da videira. Portanto, *B. velezensis* S26 é um agente promissor no controle biológico da antracnose, podridão cinzenta e pé-preto em morangueiros e videiras, não apenas reduzindo a incidência e severidade dessas doenças, mas também, estimulando o crescimento das plantas. Dessa forma, a incorporação de endósporos de *B. velezensis* S26 em bioformulações líquidas e biochares possibilita a preservação tanto da viabilidade celular durante o armazenamento quanto da capacidade de supressão de doenças fúngicas e de estímulo ao desenvolvimento vegetal, contribuindo para uma agricultura sustentável e agregando valor a subprodutos agroindustriais.

**Palavras-chave:** Antracnose, bioformulação, esporulação, podridão cinzenta, pé-preto, promoção do crescimento.

## ABSTRACT

The bioinputs has gained prominence in response to the harmful effects caused by synthetic fertilizers and pesticides on the environment and human health. The genus *Bacillus* consists of Gram-positive, endospore-forming bacteria with antagonistic potential against various phytopathogens. These bacteria also stimulate plant development and induce resistance mechanisms in plants. Consequently, the use of endospores can contribute to extending the shelf life and stability of bioformulations. This study aimed to determine the inhibitory potential of *Bacillus velezensis* S26 endospores suspensions in controlling gray mold caused by *Botrytis* spp., anthracnose caused by *Colletotrichum* spp., and black foot rot, with the causal agent being the fungus *Dactylonectria macrodidyma*. Additionally, the study sought to investigate the action of *B. velezensis* S26 endospores suspensions in promoting the growth of strawberries and grapevines and to develop liquid and dry formulations using agro-industrial by-products. Initially, trials were conducted to induce and optimize bacterial sporulation in shaking-flasks. Subsequently, the antagonistic potential of *B. velezensis* S26 endospore suspensions against isolates of *Botrytis* spp. and *Colletotrichum* spp. was evaluated both *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* trials were conducted on fruits and plants of grapevine and strawberry under controlled environmental conditions. Four bioformulations were then developed, consisting of leachate from grape marc composting and whey, either individually or in combination. The effectiveness of these formulations was determined under controlled conditions and in a commercial strawberry greenhouse. Similarly, a dry formulation was developed from two biochars derived from the pyrolysis of fresh grape pomace and previously composted grape pomace. The growth-promoting potential of these formulations was tested on the grapevine rootstock SO4 (*Vitis berlandieri* × *V. riparia*), cultivated in conventional substrate and copper-treated substrate. The effect of biochars associated with *B. velezensis* S26 endospores on black foot rot suppression was also examined. The results demonstrated that *B. velezensis* S26 endospores can effectively control anthracnose and gray mold in strawberries and grapevines. This inhibitory capacity was maintained even after six months of storage. Furthermore, cultivation in shaking-flasks and bioreactors led to *B. velezensis* S26 sporulation using compost leachate and whey as culture media. The use of these culture suspensions as liquid formulations provided performance similar to the commercial bioproduct Duravel WP® in a commercial strawberry greenhouse and promoted the growth of micropropagated strawberry plants. Finally, treatments using biochar enriched with *B. velezensis* S26 endospores contributed to minimize copper-induced stress, increase the biomass of micropropagated SO4 plants, and control grapevine black foot rot. Therefore, *B. velezensis* S26 emerges as a promising agent in the biocontrol of anthracnose, gray mold, and black foot rot, not only reducing the incidence and severity of these diseases but also stimulating the growth of these plants. As a result, the incorporation of *B. velezensis* S26 endospores into liquid bioformulations and biochars allows for the preservation of both cellular viability during storage and the ability to suppress fungal diseases and stimulate plant development, contributing to sustainable agriculture and adding value to agro-industrial waste and by-products.

**Keywords:** Anthracnose, bioformulation, black foot, sporulation, gray mold, growth promotion.