

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE *Bacillus* SOBRE O FUNGO *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*

Edvan Costa da Silva^{1*}
Wagner Menechini¹
Alexandre de Jesus Morais Magalhães²
Léo Vieira Leonel³
Carolina dos Santos Galvão⁴
Willian dos Reis⁵

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos agentes antagonistas de 4 estirpes de *Bacillus* spp. no crescimento das colônias, sobre o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. O experimento foi realizado na Universidade Estadual do Maranhão – Câmpus de Imperatriz. Foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (1- testemunha; 2- *Bacillus pulmilus*; 3- *Bacillus subtilis*; 4- *Bacillus cereus*; 5- *Bacillus* spp.) e seis repetições. Para avaliar o antagonismo foi utilizado o Método do Circulo em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, onde o antagonista foi transferido para um circulo de 6 mm de diâmetro feito na placa, e posteriormente transferiu-se um disco do micélio do fitopatógeno de 6 mm de diâmetro para o centro da placa. As placas foram incubadas em ambiente controlado. Após 48 horas foi medido o diâmetro das colônias. Nas placas testemunhas foi transferido somente o fitopatógeno. Avaliou-se o diâmetro das colônias ao oitavo dia de experimento. A bactéria *Bacillus cereus* mostrou-se eficaz como antagonista controlando o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro*.

Palavras-chave: Controle biológico, Isolamento, Tomateiro.

IN VITRO EVALUATION OF ANTAGONIC ACTIVITIES OF Bacillus ON Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* FUNGUS

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the effect of the antagonistic agents of 4 types of *Bacillus* spp. in the growth of colonies, on the phytopathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersice* fungus. The experiment was carried out at the State University of Maranhão – at the Imperatriz Campus. It was led in an entirely randomized design, with five treatments and six repetitions, (treatment 1 – witness; treatment 2- *Bacillus pulmilus*; treatment 3 – *Bacillus subtilis*; treatment 4 - *Bacillus cereus*, Treatment 5 - *Bacillus* spp.). In order to evaluate the antagonism, the Circle Method was used in Petri plates containing BDA medium, where the antagonist was transferred to a 6cm diameter circle made on the plate, and subsequently transferred to a 6mm-diameter phytopathogen mycelium disc to the center of the plate. The plates were incubated in a controlled environment. After 48 hours the diameter of the colonies was measured. In the control plates only the phytopathogen fungus was transferred. The diameter of the colonies was evaluated on the eighth day of experiment. The *Bacillus cereus* bacterium has proved itself to be effective as an antagonist by controlling the *phytopathogenic Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersice* fungus *in vitro*.

Key words: Biological control, Insolation, Tomato.

¹ Doutorando em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal C. Rondon. Rua Pernambuco, 1777 - Centro. E-mail: edvan_costa@outlook.com

² Engenheiro Agrônomo, Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, Campus Imperatriz. Rua Godofredo Viana, 1300 – Centro.

³ Mestre em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís – MA. Cidade Universitária Paulo VI, A. Lourenço Vieira da Silva, 1000, Jardim São Cristovão.

⁴ Mestra em Produção Vegetal da Universidade Estadual de Goiás, Campus Ipameri. Rodovia GO 330, Km 241, Anel Viário, Ipameri-GO.

⁵ Mestrando em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal C. Rondon. Rua Pernambuco, 1777 - Centro

INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das frutas mais consumidas e populares do mundo (NASIR et al., 2015). O Brasil manteve-se desde 2006 até 2013 como o quarto maior produtor mundial de tomates, cuja produção anual foi de 4,2 milhões de toneladas (t), sendo precedido pela China, Estados Unidos e Turquia (AGRIANUAL, 2016).

A murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, é uma importante doença do tomateiro no Nordeste brasileiro. Causa perdas em variedades sensíveis de tomate e ocorrem quando as temperaturas do solo e do ar são bastante elevadas durante grande parte da estação do verão, como em climas quentes e podendo ser encontrada em quase todas as regiões produtoras, sendo constatada inclusive em cultivos protegidos em estufas plásticas.

As estratégias disponíveis, como o uso de fungicidas e variedades resistentes têm sido amplamente ineficazes no controle da doença, devido ao fato de que o fungo é transmitido pelo solo. Além disso, há cada vez mais restrições à aplicação de fungicidas devido à preocupação pública com a poluição do meio ambiente, resíduos em alimentos e principalmente com a saúde humana. No entanto, devido a esses fatores, é necessário o desenvolvimento de uma nova estratégia de gestão que seja praticamente eficaz e ambientalmente segura (MANDAL et al., 2009). Neste sentido, Milanese et al. (2013), ao estudarem os isolados de *Trichoderma* spp., constataram o seu potencial para o controle biológico de *Fusarium* spp.

Para Romeiro (2007), entre os modos de ação sugeridos para o controle biológico de fitopatógenos, a produção de substâncias antimicrobianas é um mecanismo universal de antagonismo que agentes de biocontrole exibem com frequência. Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabólitos comercialmente importantes, como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL; GHINI, 1995).

Vários microrganismos têm sido relatados como potenciais agentes de biocontrole contra uma variedade de fungos fitopatogênicos. Os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência são as *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA et al., 2008).

O gênero *Bacillus* apresenta grande potencial de uso no controle biológico (TENDULKAR et al., 2007; YAO et al., 2006), exercendo um antagonismo direto a fitopatógenos, através de mecanismos variados (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Objetivou-se nesse trabalho avaliar *in vitro* o efeito antagônico de quatro tipos de bactérias do gênero *Bacillus* no crescimento das colônias do fungo fitopatogênico *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* causador da murcha-de-fusarium em tomateiro.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas quatro espécies de bactérias do gênero *Bacillus* (*Bacillus pulmilus*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus* e *Bacillus* ssp.) no crescimento micelial do fungo *F. oxysporum*, causador da murcha-de-fusarium na cultura do tomateiro.

Obtenção do material biológico

As estirpes de *Bacillus* (*B. pulmilus*; *B. subtilis*; *B. cereus* e *B. ssp.*) e o isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersice* utilizados no experimento, foram cedidos pelo

Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA/CESI, preservados em meio sólido 523.

Isolamento do material biológico e instalação do experimento

Para o isolamento das bactérias e do fungo fitopatogênico foi utilizado o Método de Circulo citado por Mariano (1993), em que antes da transferência dos isolados biológicos, as placas de Petri receberam um círculo de aproximadamente 6 mm de diâmetro na parte externa inferior para auxiliar na transferência das bactérias e do fungo. Na repicagem das bactérias e do fungo utilizou-se o meio de cultura BDA.

As estirpes de *Bacillus* foram inoculadas com o auxílio de um swab esterilizado, passando-o nas colônias fornecedora e logo após na placas que iria receber o tratamento, o qual se realizava o preenchimento de toda a área demarcada pelo círculo externo. Para cada espécie de *Bacillus sp.* utilizou-se um swab diferente, para evitar contaminação entre os tratamentos. Para cada espécie de *Bacillus sp.* utilizou-se um cotonete diferente, para que não ocorresse a contaminação de um tratamento com outro.

Em seguida foram retirados discos de 6 mm de diâmetro *Fol* obtidos a partir de culturas pura, e transferindo-o para o centro das placas de Petri. Para o tratamento controle foi utilizado somente *Fol* cultivado em meio BDA (MARIANO, 1993).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições, o qual um dos tratamentos não tinha nenhuma espécie de *Bacillus* (testemunha), e os demais tratamentos tinham espécies diferentes de *Bacillus* como agente antagonico (Tabela 1). Após o preparo das placas com seus respectivos tratamentos, transferiram-se as mesmas para BOD a 28°C, e fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 01. Espécies de *Bacillus sp* usados nos tratamentos.

TRATAMENTOS	ESPÉCIES DE <i>BACILLUS</i>
Tratamento 1	Testemunha
Tratamento 2	<i>Bacillus pulmilus</i>
Tratamento 3	<i>Bacillus subtilis</i>
Tratamento 4	<i>Bacillus cereus</i>
Tratamento 5	<i>Bacillus spp.</i>

Avaliação do potencial antagonico das bactérias do gênero *Bacillus* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in vitro

A avaliação do efeito antagonico de *Bacillus* sobre *Fol* foi efetuada ao oitavo dia de experimento, pela inibição do crescimento micelial, para isso efetuou-se medições do diâmetro das colônias, nos sentidos vertical e horizontal, com auxílio de uma régua graduada e, milímetro, definindo-se uma média para cada colônia (MARIANO, 1993).

A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada conforme Menten et al., 1976:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{diâmetro médio do controle} - \text{diâmetro médio do tratamento})}{\text{Diâmetro médio do controle}} \times 100$$

Os dados obtidos na avaliação do antagonismo de *Bacillus* sp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro* foram submetidos à análise de variância, sendo as medias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa ASSISTAT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se no oitavo dia que todas as quatro espécies de *Bacillus* mostraram efeito inibidor no crescimento de *Fol*, ou seja, todos os tratamentos diferiram-se estatisticamente da testemunha (Tabela 2; Figura 1).

Podemos afirmar que o teste foi significativo em nível de 5% de probabilidade. Assim os tratamentos tiveram algum tipo de interferência no crescimento do fungo devido à espécie de *Bacillus* spp. utilizadas.

Tabela-02. Avaliação da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* por isolados de *Bacillus*.

Tratamentos	Médias de crescimento das colônias	Percentagem de inibição de crescimento (%)
T1	3,85a	0,0%
T2	2,32 b	38,68%
T3	1,90 bc	49,82%
T4	1,80 c	52,39%
T5	2,33 b	38,31%

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. CV (%) = 13,94. T1= Testemunha; T2= *Bacillus pulmilis*; T3= *Bacillus subtilis*; T4= *Bacillus cereus*; T5= *Bacillus* spp.

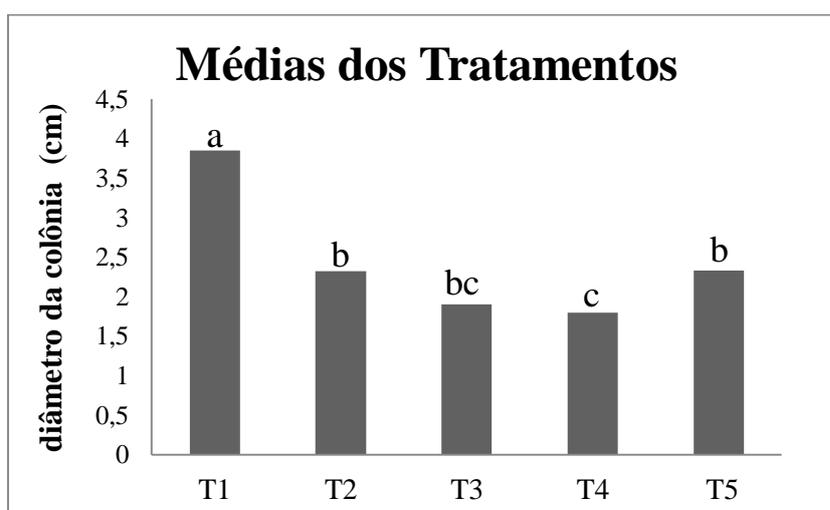


Figura 1. Médias de crescimento micelial em diâmetro da colônia do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ao oitavo dia em função da espécie de *Bacillus* sp. contidos nos tratamentos. Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

De acordo com os resultados apresentados observam-se os efeitos significativos dos isolados de *Bacillus* sp. no que se refere à inibição do desenvolvimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. De forma geral nota-se a superioridade das estirpes de *B. subtilis* (T3) e *B. cereus* (T4), que promoveram as menores médias de diâmetro de crescimento micelial e conseqüentemente as maiores percentagens de inibição do fitopatógeno. Já os isolados de *B. pumilus* (T2) e *Bacillus* spp. (T5) também se diferiram estatisticamente da testemunha, no entanto as médias de crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* foram maiores que as de *B. subtilis* e *B. cereus*, como mostra as figuras a seguir.

É importante observar que dentre esses isolados, a presença da espécie de *Bacillus cereus* (T1) é marcante, pois nota-se a superioridade como agente antagonico em comparação com as demais espécies de *Bacillus* sp. Esta espécie tem sido descrita por vários autores como biocontroladora de doenças de plantas.

Segundo Asaka e Shoda (1996), a eficiência na atividade *in vitro* apresentada por bactérias do gênero *Bacillus* está associada à capacidade que essas bactérias possuem em produzir antibióticos como *iturina A* e *sufactina*, capazes de atuar na inibição do crescimento micelial de fungos. Este eficiente mecanismo de ação de inibição do crescimento micelial de fungos, promovido por bactérias do gênero *Bacillus* foi observado no controle de *Fusarium solani* em *Lycopersicon esculentum* L. (tomate), *in vitro* e *in vivo* (MORSY et al., 2009) e *F. oxysporum* em *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *in vivo* (MORADI et al., 2012), demonstrando assim, a eficácia da atividade antagonica de *Bacillus*.

Lima et al. (2014), obteve resultado semelhante ao deste experimento, avaliando efeito de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em que testou dez estirpes de *Bacillus* ao decimo dia de experimento, observou-se que todos mostraram efeitos inibidor do fungo. Os isolados B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*Bacillus cereus*), B22' (*Bacillus pentothenicus*), B45 (*Bacillus cereus*), B47 (*Bacillus cereus*) e B25 (*Bacillus pumilus*) induziram as menores médias de diâmetro da colônia do patógeno.

Na avaliação *in vitro* do antagonismo de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) ao *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, também observou efeito antagonico de bactérias do gênero *Bacillus* sp. sobre o fitopatógeno, porém o isolado C116 (*Bacillus pumillus*) obtido de folhas de couve, mostrou-se superior ao isolado HNF15 (*Bacillus cereus*) obtido de folhas de helicônia, mostrando diferença significativa em inibir a raça R2, em relação aos demais tratamentos, confirmando o seu potencial de inibição (ALENCAR et al., 2012).

Vários autores já mencionaram que muitas bactérias, apesar de apresentarem alta atividade antimicrobiana *in vitro* contra fitopatógenos, apresentam pouco ou nenhum controle da doença na planta, ressaltando a frequente falta de correlação dos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados desses experimentos dão indícios de que os isolados de *Bacillus subtilis*, e *B. cereus* possam ser utilizados em experimentos de campo, devido à suas propriedades antifúngicas já constada *in vitro* contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

CONCLUSÃO

As bactérias do gênero *Bacillus* observadas nesse experimento mostraram-se eficientes no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro*.

Os tratamentos T3 (*Bacillus subtilis*) e T4 (*Bacillus cereus*) foram os que tiveram menores desenvolvimentos da colônia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira: Tomate**. 21 ed. São Paulo-SP: Informa economics FNP, 2016. p. 435-441.
- ALENCAR, F. C.; PAIS, A. K. L.; NASCIMENTO, M. K. B.; LIMA, H. A.; PAZ, C. D.; PEIXOTO, A. R. Avaliação in vitro do antagonismo de BPCPs ao *Fusarium f. sp. lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 30, n. 2, p. 185-191 (Suplemento - CD Rom), 2012.
- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.62, n.11, p.4081-4085, 1996.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Princípios e Conceitos. 3. ed. São Paulo-SP: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.
- CAMPOS SILVA, J. R.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, 2008.
- LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolite against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 113-121, 2008.
- LIMA, O. D. R.; OLIVEIRA, L. J. M.; SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica in vitro de isolados de *Bacillu* ssp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici¹. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 57-64, 2014.
- MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dorchester, v. 47, n. 7, p. 642-649, 2009.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.
- MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophominia phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- MILANESI, P. M.; BLUME, E.; ANTONIOLI, Z. I.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F. dos; FINGER, G.; DURIGON, M. R. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 36 n. 3, p. 347-356, 2013.
- MORADI, H.; BAHRAMNEJAD, B.; AMINI, J.; SIOSEMARDEH, A.; HAJI-ALLAHVERDIPOOR, K. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt

by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, Lismore, v.5, n.2, p.68-74, 2012.

MORSY, E. M. et al. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. **Egyptian Journal of Phytopathology**, Cairo, v.37, n.1, p.47-57, 2009.

NASIR, M. U.; JABBAR, HUSSAIN, S.; JABBAR, S. Tomato processing, lycopene and health benefits: A review. **Science Letters**, Sargodha, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2015.

ROMEIRO, R. S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas – Fundamentos**. Viçosa-MG: Ed. UFV, 2007. 269 p.

TENDULKAR, S. R.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T.K.; BALARAM, P.; CHATTOO, B.B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus lincheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2331-2339, 2007.

YAO, A. V.; BOCHOW, H.; KAMIROV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A.K. Effect of FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Londres, v. 39, n. 4, p. 323-328, 2006.