

## Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Bacillus* spp. "in vitro"

**Cícero Augusto Guimarães Fuga**

Graduando em Agronomia, Centro Universitário de Patos de Minas, UNIPAM  
e-mail ciceroguimaraesf@hotmail.com

**Daniel Célio Gonçalves**

Graduando em Agronomia, Centro Universitário de Patos de Minas, UNIPAM

**Walter Vieira da Cunha**

Professor, Doutor. Centro Universitário de Patos de Minas, UNIPAM

**Resumo:** A antracnose é relatada como a doença mais importante em frutos na fase pós-colheita, tornando os frutos impróprios para consumo e comercialização. O trabalho teve por finalidade estudar a potencialidade antagonística de isolados de *Bacillus* spp. a *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose em frutos, sob condições de laboratório. Foram estudados 16 isolados de *Bacillus* spp. quanto à capacidade de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno em cultivo pareado. Foram testados 15 isolados de *Bacillus* spp. extraídos a partir de amostras de solo e 1 isolado comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Discos de meio BDA colonizado pelo fungo de aproximadamente 0,5 cm foram colocados nos dois centros de cada metade das placas. Os isolados de *Bacillus* spp. foram transferidos com o auxílio de uma alça de platina, fazendo-se uma risca em todo o centro da placa. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. A avaliação do antagonismo ocorreu após 3 e 7 dias. Os isolados Bc-004 e Bc-44 inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno por meio de antibiose e formaram halo de inibição.

**Palavras-chave:** antracnose. efeito fungistático. controle biológico. antibiose.

**Abstract:** Anthracnose is reported as the most important disease in post-harvest fruits, turning the fruits inappropriate for consumption and marketing. The work aimed to study the antagonistic potential of isolated *Bacillus* spp. to *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose in fruits under laboratory conditions. We studied 16 isolated *Bacillus* spp. and their ability to inhibit the development of the pathogen in paired cultivation. We tested 15 isolated *Bacillus* spp. extracted from soil samples and 1 isolated from commercial *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Discs of PDA (0.5 cm of diameter) colonized with fungal mycelium were placed in two centers of each half of the Petri dishes. Isolates of *Bacillus* spp. were transferred with the aid of a platinum loop, by making a scratch across the middle of the petri dish. It was used a completely randomized design with three replications for each Petri dish being each one as an experimental unit. The evaluation of antagonism occurred after 3 to 7 days. The isolates Bc-004 and Bc-44 inhibited the mycelial growth of the pathogen through antibiosis and formed zone of inhibition.

**Keywords:** anthracnose. fungistatic effect. biological control. antibiosis.

## Introdução

As perdas que ocorrem na fase pós-colheita de frutos em função do aparecimento de podridões, normalmente oriundas do campo, são um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de frutas. No Brasil, as perdas pós-colheita de frutos tropicais, a exemplo da banana, manga, goiaba e mamão, são da ordem de 30% dos produtos comercializados. A deterioração dos frutos pode ocorrer durante a colheita, armazenamento e/ou transporte (NERY-SILVA *et al.*, 2001). A antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* é relatada como a doença mais importante dos frutos, e na ausência de medidas de controle, a incidência pode chegar a 91% de antracnose em frutos após a colheita (LIBERATO; COSTA, 1997).

A crescente demanda mundial por frutas tropicais tem exigido dos produtores e exportadores uma preocupação quanto à produção de frutas de melhor qualidade fitossanitária, tornando essencial o desenvolvimento de programas de controle de doenças (BENATO *et al.*, 2005).

Há tempos, os pesticidas químicos são usados na agricultura; entretanto, seus efeitos colaterais têm estimulado a redução de seu uso e a adoção de métodos naturais menos agressivos. O controle biológico, utilizando fungos filamentosos, leveduras e bactérias é uma técnica que tem sido relatada com sucesso (MARIANO, 1993). O controle biológico visa manter, por meio de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos em função da ação controladora dos organismos não-patogênicos do sistema (TAVARES, 1996).

Considerando-se os custos financeiros e ambientais no uso de fungicidas, assim como as crescentes restrições à presença de resíduos nos frutos, faz-se necessário o estudo de novas alternativas. Entre estas, o controle biológico torna-se uma alternativa importante e tecnicamente justificável (KUPPER *et al.*, 2003; FURLANETTO *et al.*, 1999). A prospecção de isolados bacterianos com potencial de uso em estratégias de controle biológico tem recebido atenção especial nos estudos envolvendo proteção de frutos pós-colhidos.

Espécies de *Bacillus* spp. vêm-se destacando em aplicações em pós-colheita e no filoplano. Este gênero pertence ao grupo de bactérias gram positivas, cuja característica é a produção de endósporos resistentes ao calor. Essas bactérias são encontradas naturalmente no solo, e sua ação antagonista não é específica, podendo produzir metabólitos que atuam sobre patógenos foliares ou radiculares (MELO; AZEVEDO, 2000). Dessa forma, com a identificação e seleção de bactérias antagônicas a antracnose, pode-se vir a utilizá-las em programas de manejo de *C. gloeosporioides*.

Tendo em vista a propriedade inibitória de *B. thuringiensis* sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos e a importância do fungo *C. gloeosporioides* como agente da antracnose em frutíferas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* o efeito de *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, como uma possível alternativa para o controle da podridão de pós-colheita.

## **Material e métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) da Faculdade de Engenharias e Ciências Agrárias – FAECIA.

### **Obtenção e procedência dos isolados do fitopatógeno**

O fungo *C. gloeosporioides* foi isolado a partir de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) apresentando sintomas típicos de podridão. Foram cortados discos de tecido com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro dos locais lesionados, na região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia. Esses discos foram superficialmente desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos, depois colocados em álcool a 40% por 1 minuto e, em seguida, enxaguados com água destilada e transferidos para as placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo como substrato o meio batata dextrose ágar (BDA). Em seguida, levou-se para câmara tipo BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas (MENEZES; ASSIS, 2004). Depois do aparecimento das estruturas reprodutivas do fungo, realizou-se a repicagem para outras placas com meio BDA, até a obtenção da cultura pura.

### **Obtenção de isolados de *Bacillus* spp.**

Amostras de solo coletadas na região de Patos de Minas foram utilizadas para o isolamento de *Bacillus* spp. Foi utilizado o método descrito no protocolo da World Health Organization (WHO, 1985). Neste procedimento, cada amostra de 1g de solo foi homogeneizada em 5 mL de solução salina (0.8g NaCl/L) e submetida a agitação (80 rpm), durante 12h. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo de microcentrífuga tipo “eppendorf” e incubados em banho-maria (65°C por 30 minutos). Após choque térmico para eliminar as células vegetativas, uma alíquota de 200 µL foi distribuída em placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB). O material foi então mantido em BOD (30°C por 36 horas). As colônias que cresceram foram separadas por meio da forma e coloração.

Foram testados 15 isolados de *Bacillus* spp. extraídos a partir das amostras de solo, e 1 isolado comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (produto comercial DIPEL®).

### **Antagonismo entre *Bacillus* spp. e *C. gloeosporioides* em cultivo pareado**

Foi utilizado o método de cultura pareada em placa de Petri contendo meio de cultura, conforme descrito por Dennis e Webster (1971), com algumas modificações. Para isso, o isolado fúngico foi transferido com estilete flambado para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA. Discos do meio colonizado com o fungo de aproximadamente 0,5 cm foram colocados nos dois centros de cada metade das placas. Os isolados de *Bacillus* spp. foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina, fazendo-se uma risca em todo o centro da placa, com exceção das placas controle (testemunha),

sem bactéria. As placas foram mantidas a 25°C em BOD sob fotoperíodo de 12 horas, sendo avaliadas aos 3 e 7 dias de incubação. O potencial de antagonismo dos isolados foi avaliado por meio de medições do crescimento micelial dos fitopatógenos com o auxílio de paquímetro digital (marca Worker).

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do software 'Statística' (STATSOFT, 2004).

### **Resultados e discussão**

Os isolados bacterianos tiveram efeitos diferentes em relação ao crescimento micelial do fungo aos 3 e 7 dias de incubação (Tabela 1). Alguns isolados não apresentaram nenhum efeito inibitório sobre o crescimento do fungo (Tabela 1). Por outro lado, em ambos os períodos avaliados, os isolados Bc-004, Bc-44 e Bc-003 reduziram significativamente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em relação à testemunha, com formação de halo de inibição, resultado da liberação de metabólitos pelos isolados, os quais podem ser responsáveis pela inibição do crescimento do fungo. Este efeito inibitório pode estar relacionado com a produção de quitinases e de outras enzimas que podem ter ação contra a parede celular fúngica, já que algumas bactérias antagonistas de fungos fitopatogênicos podem produzir quitinases (MAVINGUI; HEULIN, 1994).

Os isolados Bc-004 e Bc-44 foram os que mostraram maior eficiência na redução do crescimento micelial do fitopatógeno, diferenciando estatisticamente da maioria dos isolados e da testemunha. Em contrapartida, o isolado comercial de *B. thuringiensis var. kurstaki* não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à testemunha e à maioria dos isolados de *Bacillus* spp. (Tabela 1).

Avaliando o efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis*, Batista Junior *et al.* (2002) verificaram inibição da bactéria em relação ao crescimento de *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. Furlani *et al.*, (2007) e Costa (2001) também obtiveram resultados satisfatórios na inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* com isolados de *Bacillus* spp. utilizando a técnica de cultivo pareado.

O uso de substâncias derivadas do metabolismo de rizobactérias tem se mostrado promissor no controle de doenças fúngicas em diversos patossistemas, como *Hemileia vastatrix* em cafeeiro (BETTIOL *et al.*, 1994), *Colletotrichum acutatum* em citros (KUPER *et al.*, 2003) e outros fungos fitopatogênicos como *Alternaria* sp. e *Botrytis* sp. (ANGONESE, 2009).

A inibição do crescimento de *C. gloeosporioides*, sob condições *in vitro*, ocorreu devida à antibiose, uma vez que impediram o desenvolvimento do fitopatógeno (ARRAS; ARRU, 1997, citado por KUPPER *et al.*, 2003). Microrganismos que agem por antibiose geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido. A constatação da produção de substâncias inibidoras produzidas pelos isolados de *Bacillus* spp. ao *C. gloeosporioides* é importante para o entendimento do mecanismo de ação do antagonismo, possibilitando, dessa forma, o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas.

Os bons resultados de antagonismo obtidos *in vitro* nem sempre são garantias de eficiência em programas de manejo; muitas vezes, a eficácia dos antagonistas *in vitro* podem ser insuficientes perante uma série de fatores, uma vez que as condições em laboratório são controladas de forma que o isolado apresente máximo desempenho.

**Tabela 1.** Efeito fungistático de isolados de *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial (diâmetro da colônia) de *Colletotrichum gloeosporioides* em dois períodos de incubação.

Incubação por 3 dias			Incubação por 7 dias		
Isolado	Diâmetro (mm)		Isolado	Diâmetro (mm)	
Bc-004	8,1	a <sup>1</sup>	Bc-004	9,3	a
Bc-44	10,0	a b	Bc-44	11,1	a
Bc-003	12,5	a b	Bc-003	14,7	a b
Bc-006	12,9	a b	Bc-225	19,1	b
Bc-87	13,4	b	Bc-30C	19,2	b
Bc-208	13,5	b	Bc-208	20,4	b c d
Bc-30C	13,5	b c	Bc-238	20,6	b c d
Bc-225	14,0	b c	Bc-001	22,0	c d
Bc-238	14,4	b c	Bc-002	22,5	c d
Bc-005	14,5	b c	<i>Bt. kurstaki</i>	22,5	c d
Bc-146C	14,6	b c	Bc-252	22,9	c d
Bc-002	15,3	c	Bc-146C	23,5	c d
Bc-252	15,4	c	Bc-369	23,7	c d
Bc-369	15,7	c	Bc-006	24,0	c d
Bc-001	16,5	c	Bc-005	24,0	c d
Testemunha	16,5	c	Bc-87	24,3	c d
<i>Bt. kurstaki</i>	16,6	c	Testemunha	26,3	d

(1) Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### Conclusão

Os isolados apresentaram variação quanto à atividade antifúngica *in vitro* contra *C. gloeosporioides*, sendo os isolados Bc-004 e Bc-44 os mais promissores, chegando a exercer inibição no crescimento micelial do patógeno.

### Referências

ANGONESE, M. T.; GIUSTINA JUNIOR, D.; PAIM, L. H.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; OLIVEIRA FILHO, P. C.; RIBEIRO, R. T. S. Efeito fungistático de

*Bacillus* spp. sobre fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. P. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, n. 5, p. 555-557, set./out., 2004.

BATISTA JÚNIOR, C. B.; ALBINO, U. B.; MARTINES, A. M.; SARIDAKIS, D. P.; MATSUMOTO, L. S.; AVANZI, M. A.; ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, 2002.

BETTIOL, W.; SAITO, M. L.; BRANDÃO, M. S. B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica*, v. 20, p. 119-122, 1994.

COSTA, F. G. *Controle biológico de Colletotrichum acutatum agente causal da flor preta do morangueiro*. 2001. 45f. Monografia, (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

BENATO, E. A., SIGRIST, J. M. M.; ROCHA, P. *Manuseio, aspectos fitossanitários e logísticidade de caqui pós-colheita*. 2005. (Boletim Técnico).

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 57, p. 359-363, 1971.

FURLANETTO, C., TOMITA, C. K.; CAFÉ FILHO, A. C. Efeito da época de aplicação de fungicida no controle da mancha de *Mycosphaerella* do morangueiro. *Horticultura Brasileira*, v. 17, p. 231-233, 1999.

FURLANI, A. C. F. A.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. C.; PEREIRA, C. F. Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*. *Científica*, v. 35, n. 2, p. 196 - 200, 2007.

HANNADA, R. E. *Controle de Phytophthora palmivora, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacaueiro com fungos endofíticos*. 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

LIBERATO, J. R. ; COSTA, H. . Incidência de antracnose e podridão peduncular em frutos de mamoeiro em Linhares - ES. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, p. 276-276, 1997.

KUPPER, K. C., GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 251-257, 2003.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão anual de Patologia de Plantas*, v. 1, p. 369-409, 1993.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle Biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 388p.

MAVINGUI, P.; HEULIN, T. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 26, p. 801-803, 1994.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. *Guia prático para fungos fitopatogênicos*. 2 ed. Recife, Imprensa Universitária, UFRPE, 2004.

NERY-SILVA, F. A.; MACHADO, J. da C.; LIMA, L. C. O.; RESENDE, M. L. V. Controle químico dos agentes causadores da podridão peduncular de mamão (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, n. 3, p. 519-524, 2001.

STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). 2004.

TAVARES, S. C. C. H. Controle biológico clássico de patógenos de frutos no Brasil - situação atual. In: *SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO- SICONBIOL*, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. Anais: Conferências e palestras. Curitiba: COBRAFI/EMBRAPA-CNPSO, p. 57-68, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Informal Consultation on the Development of Bacillus sphaericus as a microbial larvicide*. Genebra, UNDP/World Bank/ Who Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. s/p. 1985.