

Efeito antagonista de *Bacillus* spp. sobre o fungo *Fusarium verticillioides*

Antagonist effect of Bacillus Spp. on the fungus Fusarium Verticillioides

NATHÁLIA SILVA PORTO

Discente de Agronomia (UNIPAM)

nathaliaporto@unipam.edu.br

JANAÍNE MYRNA RODRIGUES REIS

Professora orientadora (UNIPAM)

janaine@unipam.edu.br

Resumo: O fungo *Fusarium verticillioides* causa grandes perdas de produtividade e qualidade de grãos, principalmente no milho. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antagonístico *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp. no controle do *Fusarium verticillioides*. O experimento foi conduzido em laboratório em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 11 tratamentos (dez cepas *Bacillus* spp. e um Controle) e seis repetições. Foi utilizada a técnica de culturas pareadas, adicionando-se em placas de Petri um disco contendo o micélio fitopatogênico e do lado oposto a bactéria. As placas foram incubadas em BOD a 25° C. Após 15 dias, foram avaliados o crescimento micelial e a zona de inibição. Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, em que se verificou diferença estatística de oito cepas de bactérias em relação ao controle. Concluiu-se que as oito cepas das bactérias possuem potencial antagonístico no controle *in vitro* de *F. verticillioides*.

Palavras-chave: bactéria; biocontrole; fitopatogênico; *in vitro*.

Abstract: The fungus *Fusarium verticillioides* causes significant losses in grain productivity and quality, especially in corn. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* antagonistic potential of *Bacillus* spp. strains in controlling *Fusarium verticillioides*. The experiment was conducted in the laboratory in a Completely Randomized Design (CRD) with 11 treatments (ten *Bacillus* spp. strains and one Control) and six replications. The paired cultures technique was used, adding a disk containing the phytopathogenic mycelium to Petri dishes and the bacteria on the opposite side. The plates were incubated in a BOD at 25°C. After 15 days, mycelial growth and the inhibition zone were evaluated. The data were subjected to Tukey's test, which showed a statistical difference for eight bacterial strains compared to the control. It was concluded that the eight bacterial strains have antagonistic potential in the *in vitro* control of *F. verticillioides*.

Keywords: bacteria; biocontrol; phytopathogen; *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis por elevadas perdas produtivas em culturas agrícolas devido à sua diversidade, à ampla distribuição, à variedade de

hospedeiros e aos eficientes mecanismos de disseminação (Farias, 2020). Entre as principais espécies desse gênero, encontra-se o *Fusarium verticillioides* (sinônimo, *F. moniliforme*), que está intimamente associado com o milho e suas regiões produtoras. Esse fungo provoca podridões de colmo e espiga, causando grandes perdas de produtividade e qualidade de grãos. Além disso, pode produzir micotoxinas com efeitos tóxicos para animais e humanos (Porto, 2018).

O método de controle predominantemente usado para suprimir esse patógeno é a aplicação de produtos químicos. Entretanto, a eficiência desse manejo tem apresentado redução devido ao uso intensivo e indiscriminado que seleciona variantes de fitopatógenos resistentes e elimina microrganismos benéficos presentes no solo. Ademais, acarreta efeitos negativos ao meio ambiente e aumento do custo de produção para o agricultor (Alves, *et al.* 2013).

Diante disso, técnicas alternativas para controle e manejo desse fungo estão sendo consideradas para que os problemas advindos do uso excessivo e incorreto de químicos sejam sanados. Uma dessas técnicas é o uso de controle biológico, que consiste na redução do inóculo ou das atividades da doença por um microrganismo com potencial antagonista. Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são a antibiose, parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo, competição e indução de resistência. (Farias, 2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* têm grande facilidade de colonização e multiplicação no solo, onde conseguem atuar como antagonistas a fitopatógenos (Carrer Filho, Dianese, Cunha, 2015). Nesse sentido, destacam-se principalmente, devido ao fato de apresentarem estruturas de resistências e de exibirem uma multiplicidade de mecanismos antagônicos (Carrer Filho, 2014).

Desse modo, esses procaríotos são considerados importantes agentes de biocontrole, porque apresentam baixo custo e nenhuma agressividade ao ecossistema (Silva *et al.* 2004). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antagônico *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp. no controle do *Fusarium verticillioides*.

2 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2024, no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia, no Bloco H, do Centro Universitário de Patos de Minas – MG (UNIPAM).

2.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CEPAS DE *Bacillus* spp. E DO *Fusarium verticillioides*

As cepas de *Bacillus* spp. utilizadas foram extraídas do solo em diferentes locais na região do Alto Paranaíba (MG), utilizando a metodologia descrita no protocolo World Health Organizations (WHO, 1985). Nesse método, cada amostra de 1 g de solo foi homogeneizada em 5 mL de solução salina (0,8 g NaCl/L) e levada à agitação a 80 rpm por um período de 12 horas. Após isso, uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubos tipo “ependorf” e colocado em banho-maria à temperatura de 65° C durante 30 minutos. Realizou-se um choque térmico em gelo; em seguida, plaqueou-se uma

alíquota de 200 ul em placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB). Posteriormente, o material foi incubado em estufa bacteriológica a 30° C, por 48 h.

O isolado do fungo *Fusarium verticillioides* foi obtido de multiplicação própria do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do UNIPAM. O fungo foi repicado em placa de Petri com meio Batata Dextrose Ágar (BDA) para purificar e para evitar possíveis contaminações.

2.2 PREPARO DO MEIO DE CULTURA ÁGAR NUTRIENTE (AN) + BATATA DEXTROSE ÁGAR (BDA)

O meio de cultura utilizado para a montagem do experimento foi o Ágar Nutriente (AN) mais o meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Sendo assim, para o preparo de um litro de meio de cultura, foram utilizados 1000 mL de água destilada, 2,5g de peptona, 1,5g de extrato de carne, 4g de cloreto de sódio, 19,5g de BDA e 12,5g de ágar. Após a pesagem, os produtos foram transferidos para o Erlenmeyer juntamente com água. Em seguida, com auxílio de um bastão de vidro, foi misturado até a dissolução. Posteriormente, o Erlenmeyer foi vedado e levado para autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 120°C (Mello *et al.*, 2011). Além disso, as placas de Petri com dimensões de 90x15mm e volume de 30 mL cada uma também foram autoclavadas para esterilização.

Após a autoclavagem dos materiais, o meio de cultura foi transferido para placas de Petri dentro da câmara de fluxo. Posteriormente, utilizou-se a luz germicida UV durante 20 minutos para evitar contaminação. Em seguida, com o meio de cultura solidificado, as placas foram fechadas e vedadas com plástico filme.

2.3 ANÁLISE ANTAGONISTA DE *Bacillus* spp. E *Fusarium verticillioides*

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC) com 11 tratamentos e 6 repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental (Tabela 1). Para análise de antagonismo foram avaliados dez isolados de *Bacillus* spp. e um tratamento controle.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio intitulado “Efeito antagonista de *Bacillus* spp. sobre o fungo *Fusarium verticillioides*”. Patos de Minas – MG, 2024

Tratamentos	Produtos
T1	cepa <i>Bacillus</i> spp. 1
T2	cepa <i>Bacillus</i> spp. 2
T3	cepa <i>Bacillus</i> spp. 3
T4	cepa <i>Bacillus</i> spp. 4
T5	cepa <i>Bacillus</i> spp. 5
T6	cepa <i>Bacillus</i> spp. 6
T7	cepa <i>Bacillus</i> spp. 7
T8	cepa <i>Bacillus</i> spp. 8

EFEITO ANTAGONISTA DE BACILLUS SPP. SOBRE O FUNGO FUSARIUM
VERTICILLIOIDES

T9	cepa <i>Bacillus</i> spp. 9
T10	cepa <i>Bacillus</i> spp. 10
T11	Controle

Fonte: dados da pesquisa, 2023.

Para o teste, foi utilizada a técnica de culturas pareadas, em que foi adicionado, em placas de Petri contendo meio AN + BDA, um disco de 0,8 cm de diâmetro, contendo micélios do fitopatógeno posicionados a 1,0 cm da borda da placa. Posteriormente, o isolado bacteriano foi inoculado por uma estria reta, com o auxílio de uma alça de platina, do lado oposto da placa e a uma distância de 1,0 cm da borda.

O controle consistiu em depositar um disco contendo micélio do fungo de 0,8 cm de diâmetro a 1,0 cm de distância da borda da placa, sem a semeadura da bactéria. Após a implantação do experimento, as placas foram transferidas para a incubadora BOD e mantidas a 25° C, por 15 dias. Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

2.4 AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após 15 dias de incubação, foi realizada a avaliação do crescimento micelial a partir da mensuração do diâmetro da colônia do fitopatógeno, com o auxílio de um paquímetro. Além disso, foi calculada a zona de inibição (ZI) de cada microrganismo com metodologia descrita por Campanile *et al.* (2007), utilizando a seguinte expressão: $ZI (\%) = (N1 - N2 / N1) \times 100$, sendo: (ZI)% = percentagem da zona de crescimento; N1= raio do micélio encontrado na ausência do antagonista; N2= raio do micélio na presença do antagonista.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA, Teste F a 5% de probabilidade), e os tratamentos comparados por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade com auxílio do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 2, observou-se que a cepa *Bacillus* spp. 4 apresentou porcentagem de inibição de aproximadamente 65% e crescimento micelial de 2,7 cm. As cepas *Bacillus* spp. 9, 7 e 8 foram semelhantes estatisticamente e apresentaram inibição do fungo de 45,4%, 57,5% e 59,8%, respectivamente, e o crescimento micelial não ultrapassou 4,3 cm.

Nota-se que as cepas *Bacillus* spp. 2, 3, 6 e 5 apresentaram porcentagem de inibição entre 42% e 44% e o crescimento micelial do *F. verticillioides* de 4,4 cm a 4,3 cm e não evidenciaram diferença estatística entre si. Já as cepas *Bacillus* spp. 10 e 11 não apresentaram inibição contra o fitopatógeno e não mostraram diferenças significativas quando comparados com o controle.

Tabela 2 – Zona de inibição (%) e crescimento micelial (cm) do fungo *Fusarium verticillioides* em teste de culturas pareadas com 10 cepas de *Bacillus* spp. visando ao biocontrole. Patos de Minas-MG, 2024.

Tratamento	Zona de inibição (%)	Crescimento Micelial (cm) *
cepa <i>Bacillus</i> spp. 4	64,764	2,766 a
cepa <i>Bacillus</i> spp. 9	59,873	3,150 a b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 7	57,541	3,333 a b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 8	45,439	4,283 a b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 2	44,803	4,333 b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 3	43,312	4,450 b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 6	42,892	4,483 b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 5	42,892	4,483 b
cepa <i>Bacillus</i> spp. 11	10,191	7,050 c
cepa <i>Bacillus</i> spp. 10	2,981	7,616 c
Controle	0,000	7,850 c

*Média de seis repetições, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: dados da pesquisa, 2023.

Segundo Brzezinska & Jankiewicz (2012), a porcentagem de inibição do crescimento micelial se enquadra em quatro critérios: sem inibição (0 – 20%), inibição moderada (21-30%), inibição forte (31-50%) e inibição muito forte (> 50%). Dessa maneira, no presente estudo, as cepas 10 e 11 não apresentaram inibição do crescimento micelial e as demais cepas demonstraram uma inibição que variou de forte a muito forte.

No estudo de Alves *et al.* (2013), em que foi avaliada a atividade antagonista de isolados de bactérias contra *F. verticillioides*, os maiores índices de inibição das bactérias B.1433, B.01 e B.BAC expressaram 53,10%, 52,50% e 50,00% de inibição, respectivamente. Dessa forma, os autores demonstraram que nas avaliações não se apresentou inibição muito forte, mas apenas forte, diferentemente do que ocorreu no presente trabalho.

Baard *et al.* 2023 avaliaram o potencial de biocontrole de *Bacillus subtilis* e *Bacillus tequilensis* contra quatro espécies de *Fusarium*, constatando-se que o *F. verticillioides* foi significativamente inibido por todos os isolados bacterianos após 12 dias. Tais resultados distinguem-se do que aconteceu no presente estudo, em que duas das dez cepas não apresentaram potencial de inibição significativo após 15 dias da montagem do experimento.

Em trabalho semelhante, avaliando o potencial de *Bacillus* spp. controlar *F. verticillioides*, Ferreira *et al.* (2021) observaram que a inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios do patógeno está relacionada à produção de metabólitos, como os lipopeptídeos. Ademais, de acordo com Konde (1984), o antagonismo também pode ocorrer pela produção de bacteriocinas, bem como pela competição por elementos essenciais ao desenvolvimento do fitopatógeno *in vitro*. Dessa forma, tais trabalhos corroboram a explicação da inibição do fitopatógeno no presente estudo, em que é

EFEITO ANTAGONISTA DE BACILLUS SPP. SOBRE O FUNGO FUSARIUM
VERTICILLIOIDES

notório o antagonismo das bactérias, que pode ter ocorrido principalmente pela produção de metabólitos e bacteriocinas.

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se que as cepas *Bacillus* spp. 4, 9, 7, 8, 2, 3, 6, 5 possuem potencial antagonico no controle *in vitro* de *Fusarium verticillioides*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. N. T. D. *et al.* Seleção de microrganismos antagonistas para biocontrole de *Fusarium verticillioides* na cultura do milho (*Zea mays* L.). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013.
- BAARD, V. *et al.* Biocontrol Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against Four *Fusarium* Species. 12, 254. **Pathogens**, 2023.
- BRZEZINSKA, M. S., JANKIEWIEZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Curr Microbiol**, v. 65, p. 666-672, 2012.
- CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity fo endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in plant tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 237-246, 2007.
- CARRER FILHO R., DIANESE, E. C., CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesq. Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 356-363, 2015.
- CARRER FILHO, R. **Detecção de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e biocontrole da murcha de fusário em tomateiro com *Bacillus* sp.** 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitossanidade) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2014.
- FARIAS, O. R. ***Fusarium* spp. associado a sementes de girassol.** 2020. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB. 2020.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância.** Lavras (MG): UFLA, 2010.
- FERREIRA, T. C. *et al.* Potencial de *Bacillus* spp. em promover o crescimento e controlar *Fusarium verticillioides* em milho. **Summa Phytopathologica**, v.47, n.4, p.195-203, 2021.

KONDE, B. K. Studies on soil streotomycetes from Maharashtra III. Antimicrobial properties. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, Pune, v. 9, p. 8-10, 1984.

MELLO, S. C. M. de; REIS, A.; SILVA, J. B. T. da. **Manual de curadores de Germoplasma – Microrganismos: fungos filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

PORTO, V. B. C. **Quantificação de *Fusarium verticillioides* e supressividade em sistemas de rotação de culturas milho/soja**. Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

SILVA, H. S. A. *et al.* Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 6, p. 371-375, 2004.

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