

**PROSPECÇÃO DE *Bacillus subtilis* COMO AGENTE DE BIOCONTROLE CONTRA *Fusarium* sp.**

**PROSPECTING OF *Bacillus subtilis* AS BIOCONTROL AGENTS AGAINST *Fusarium* sp.**

**OSIEL SILVA GONÇALVES**

Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas (Universidade de Rio Verde, Rio Verde, GO)  
osiel.goncalves@outlook.com.br

**TÁLITA CAMPOS ALMEIDA**

Graduanda em Ciências Biológicas (Universidade de Rio Verde, Rio Verde, GO)  
tca\_thalita@hotmail.com

**CAROLINE SILVA VILELA**

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas (Universidade de Rio Verde, Rio Verde, GO)  
csvilela@gmail.com

**DÉBORA CABRAL MACHADO**

Docente da Faculdade de Ciências Biológicas (Universidade de Rio Verde, Rio Verde, GO)  
debora@unirv.edu.br

**Resumo:** A utilização de agrotóxicos nas práticas agrícolas tem promovido diversos problemas de ordem ambiental. Diante desta problemática, o biocontrole vem tornando-se uma das alternativas no manejo de fitopatógenos. Os objetivos deste estudo foram isolar a bactéria *Bacillus subtilis* de diferentes amostras de solo e avaliar sua atividade de antagonismo sobre o fungo *Fusarium* sp. Cinco isolados de *B. subtilis* removidos do rizoplano do Milho (*Zea mays*), Carvoeiro (*Tachigali vulgaris*) e Lixeira (*Curatella americana*), foram testados através do método de cultura pareada contra o *Fusarium* sp. Os resultados obtidos revelaram a inibição de 50–60% no crescimento de *Fusarium* sp., não havendo diferença estatisticamente significativa do efeito inibidor entre os isolados. Estes resultados corroboram com a literatura científica a respeito da eficiência de *B. subtilis* como agente de biocontrole e subsidia através de métodos clássicos a bioprospecção da rizobactéria de solos agrícolas e sob vegetação de Cerrado.

**Palavras-chave:** Antibiose. Biocontrole. Bioprospecção.

**Abstract:** Extensive use of agrochemicals has been led to adverse impact on the environment. Therefore, biological control has been applying as an alternative method for plant disease management. Here, we reported the characterization of *Bacillus subtilis* isolated from two types of soils with different vegetation conditions and tested their antagonism activity against *Fusarium* sp., an important plant pathogen. Based on dual culture technique the antagonism activity was conducted in vitro conditions. The antifungal metabolites produced by the five *B. subtilis* caused 50–60% inhibition of *Fusarium* sp. growth. This result supports the efficiency of *B. subtilis* as a biocontrol agent and open perspective into bacteria bioprospecting through classical methods.

**Keywords:** Antibiosis. Biocontrol. Bioprospecting.

## INTRODUÇÃO

Fatores abióticos e bióticos são responsáveis por causarem uma série de danos e limitarem a produtividade de grandes culturas de importância econômica, com destaque para as doenças que, em geral são controladas pelo uso de agroquímicos (VIDA et al., 2004). Os agroquímicos, desde sua origem, têm sido uma importante ferramenta no manejo agrícola. Entretanto, seu uso indiscriminado tem promovido diversos problemas de ordem ambiental e na saúde pública (AKTAR et al., 2009).

Baseado em práticas sustentáveis e conservacionistas, o biocontrole vem sendo uma das alternativas no manejo integrado de pragas e doenças, contribuindo ainda para minimizar os efeitos adversos provocados pelo padrão químico convencional nos sistemas agrícolas (BALE et al., 2008).

Pesquisas sobre as interações entre microrganismos têm revelado a potencialidade destes seres vivos como agentes de biocontrole na agricultura. Em particular a plasticidade metabólica bacteriana, capaz de suprimir o crescimento de outros microrganismos, possibilitando o desenvolvimento de produtos biológicos baseados nesta característica peculiar das bactérias (WHIPPS, 2001).

O gênero *Bacillus* é descrito como um dos principais grupos microbianos com capacidade de agir no controle de fitopatógenos através de síntese de metabólitos secundários, que, em geral, apresenta ampla gama de inibição às diversas espécies de fitopatógenos (SANSINENEA & ORTIZ, 2012). *Bacillus* spp., incluindo a espécie *B. subtilis*, pode ser isolado em abundância do solo, assim como em diferentes configurações ambientais devido sua capacidade de formar endósporos altamente resistentes em resposta à deficiência de nutrientes e outros estresses ambientais (SONENSHEIN et al., 2002).

Dentre os fungos fitopatogênicos, algumas espécies do gênero *Fusarium* são reconhecidas como agentes etiológicos de doenças em vegetais de importância agrícola como observado na tabela 1.

**Tabela 1.** Principais doenças provocadas por *Fusarium* spp. em culturas de importância econômica no Brasil

Culturas	Doenças	Espécies
Algodão	Murcha de fusarium	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>
Arroz	Mal do colo	<i>F. oxysporum</i>
Cacau	Galha-de- pontos-verdes	<i>F. decemcellulare</i>
Café	Fusariose	<i>Fusarium</i> spp.
Cana-de-açúcar	Podridão de Fusarium	<i>F. subglutinans</i>
		<i>F. moniliforme</i>
Feijão	Amarelecimento de Fusarium	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
	Podridão radicular	<i>F. solani</i>
Milho	Podridão do colmo	<i>F. moniliforme</i>
	Podridão de espiga	
Soja	Síndrome morte súbita	<i>F. solani</i>
Sorgo	Podridão vermelha do colmo	<i>F. graminearum</i>
	Damping-off	<i>F. moniliforme</i>
Trigo	Giberela	<i>F. graminearum</i>
	Podridão comum de raízes	

Fonte: KIMATI et al., 2005

Considerando as propriedades funcionais da espécie *B. subtilis* e sua vantajosa aplicação biotecnológica na agricultura, este trabalho teve como objetivo isolar a rizobactéria e testar sua atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *Fusarium* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção e processamento das amostras

Amostras de solos agrícolas e sob vegetação nativa de Cerrado foram coletadas no campus universitário “Fazenda Fontes do Saber” da Universidade de Rio Verde em Rio Verde, Goiás, e conduzidas ao Laboratório de Microbiologia Geral da universidade para a condução das análises microbiológicas. Aproximadamente 50g de solo foram removidos do rizoplano das seguintes espécies vegetais: Milho (*Zea mays*); Carvoeiro (*Tachigali vulgaris*); e Lixeira (*Curatella americana*). Dez gramas de cada amostra foram homogeneizados com 90 mL de água peptonada (H<sub>2</sub>Op) esterilizada e tratadas termicamente a 80°C por 12 min em banho-maria, com o intuito de favorecer o isolamento bactérias formadoras de endósporos (SLEPECKY & HEMPHILL, 1992). A diluição seriada das amostras, em H<sub>2</sub>Op, foi conduzida nas concentrações 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. Posteriormente 1 ml de cada diluição foi

inoculado na superfície do Agar Nutriente (AN), e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

### **Caracterização convencional de *B. subtilis***

As colônias características para espécie *B. subtilis* foram selecionadas para os testes morfológicos, estruturais (Coloração Diferencial de Gram e coloração de Schaffer-Fulton) e bioquímicos (Síntese de amilase, Voges-Proskauer/Vermelho de Metila - VP/VM, Degradação do Citrato e Crescimento em AN adicionado de 6,5% NaCl), seguindo a metodologia do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (BUCHANAN & GIBBONS, 1975).

### **Isolamento e caracterização do *Fusarium* sp.**

O fitopatógeno foi isolado a partir de sementes de feijão através do método de papel filtro (teste de blotter) seguindo a metodologia de Henning (2004). As sementes de feijão foram superficialmente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 1 % por 1 minuto, foram distribuídas sobre o papel filtro estéreis embebido com água destilada e incubadas a 25°C durante 7 dias. Após este período foi avaliada a incidência de fungos e a observação das características coloniais e morfológicas, através dos microscópios estereoscópico e óptico, confirmou se tratar do fungo do gênero *Fusarium*.

### **Antibiiose**

Os isolados de *B. subtilis* foram confrontados, através do método de culturas pareadas, contra o *Fusarium* sp. para avaliar seus potenciais de antagonismo. Um disco micelial de 0,5 cm de *Fusarium* sp. foi inoculado no centro da placa de Petri contendo o meio batata dextrose ágar (BDA). Posteriormente os isolados de *B. subtilis* foram inoculados nas extremidades das placas, obedecendo à distância de 2,5 cm entre os microrganismos. As placas foram mantidas a temperatura de 25°C durante 7 dias. Após esse período, foi calculada a porcentagem de inibição adotando o parâmetro formular  $(R1-R2)/R1 \times 100$ , proposto por Whipps et al. (1987). Onde, R1 é a maior distância radial do micélio do *Fusarium* sp. na ausência do antagonista, e R2 é a distância do crescimento do fungo do ponto de inoculação até a margem da colônia em

direção ao antagonista. O experimento foi conduzido em triplicata para os diferentes isolados bacterianos.

### Análises estatísticas

Os dados obtidos dos ensaios de antibiose foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey, ambos considerando o valor de significância  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no programa R, versão 3.2.4. (R CORE TEAM, 2016).

136

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Isolamento e caracterização

Foram selecionados cinco isolados bacterianos, codificados como FC1, FC2, FC3, CE1 e CE2 da rizosfera de três espécies vegetais em solos agrícolas e sob vegetação nativa de Cerrado (Tabela 2).

**Tabela 2.** Descrição dos isolados e suas respectivas fontes de origem

<b>Id isolado</b>	<b>Fonte*</b>	<b>Origem</b>
FC1	Carvoeiro ( <i>Tachigali vulgaris</i> )	Cerradão - Universidade de Rio Verde
FC2		
FC3	Lixeira ( <i>Curatella americana</i> )	Cerrado stricto sensu - Universidade de Rio Verde
CE1	Milho ( <i>Zea mays</i> )	Solo agrícola - Universidade de Rio Verde
CE2		

\*todos isolados obtidos da rizosfera.

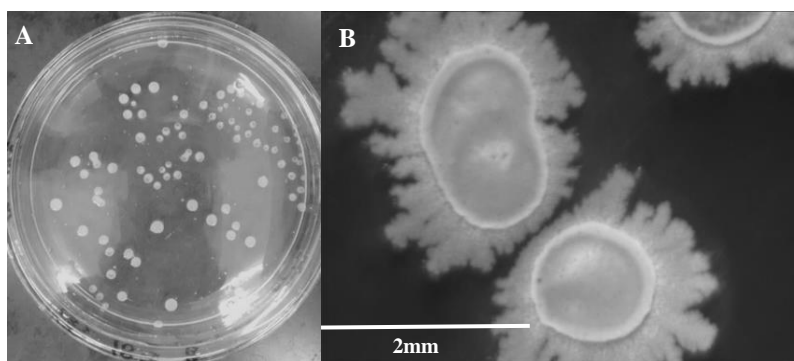
**Fonte:** Autores, 2017.

O tratamento térmico das amostras de solo apresentou-se eficiente na seleção *Bacillus* spp., inibindo o crescimento de espécies contaminantes e possibilitando o isolamento na diluição  $10^{-3}$ . O tratamento térmico de amostras ambientais auxilia de triagem de bactérias coma capacidade de formar endósporos. Nesse sentido, Melo (1999) sugere a associação de metodologias, que combinam o pré tratamento, como aquecimento das amostras de solo e meios seletivos, visando o isolamento de bactérias formadoras de endósporos como agentes de biocontrole na rizosfera. A eficiência desse processo de isolamento é amplamente usada na

busca de potenciais biotecnológico com base na prospecção de *Bacillus* spp. no setor agrícola, como no controle de nematoides por *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (MOKBEL, 2013) e insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera por *B. thuringiensis* (PRAÇA et al., 2004). Nesse estudo, o tratamento térmico foi eficiente no *screening* de *Bacillus* spp., contribuindo na otimização de tempo para identificação das espécies por testes bioquímicos.

Segundo Buchanan & Gibbons (1975), as colônias de *B. subtilis* são irregulares, opacas, espalhadas na superfície do ágar e de coloração esbranquiçada (Figura 1A). Nos cultivos mais velhos apresentam um aspecto seco rugoso e filamentososo (Figura 1B). Seguindo estas orientações, colônias sugestivas de serem de *B. subtilis* foram submetidas às análises morfológicas, estruturais e bioquímicas.

**Figura 1.** Isolados de *Bacillus* spp. (A) Diluição a  $10^3$  ilustrando as colônias isoladas; (B) Características coloniais para *B. subtilis*



**Fonte:** Autores, 2017.

A tabela 3 contém os resultados dos testes que confirmaram como sendo de *B. subtilis* os isolados analisados.

**Tabela 3.** Características morfológicas, estruturais e bioquímicas avaliadas para identificação dos diferentes isolados

Características	FC1	FC2	FC3	CE1	CE2
Morfologia	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Coloração de Gram	+	+	+	+	+
Síntese de Amilase	+	+	+	+	+
Prova do VM/VP	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
Prova de degradação do Citrato	+	+	+	+	+
Crescimento em 6,5% NaCl	+	+	+	+	+
Crescimento à 50° C	+	+	+	+	+
Esporulação	+	+	+	+	+
Síntese de Catalase	+	+	+	+	+

(+) positivo (-) negativo

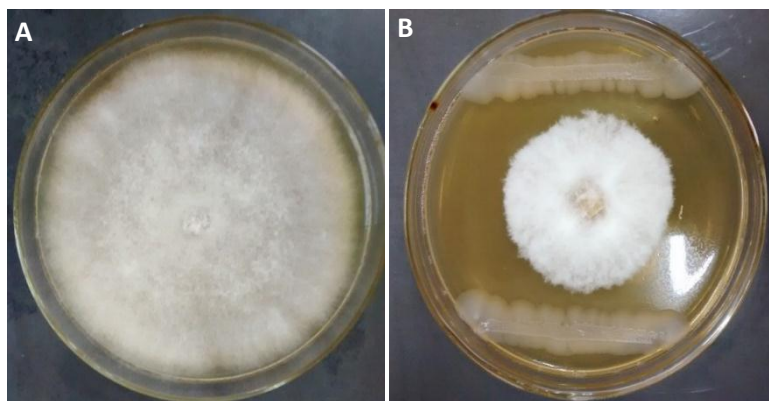
**Fonte:** Autores, 2017.

Amin et al., (2015) seguindo a metodologia proposta pelo Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, a mesma aqui empregada, identificou pelas características morfológicas e bioquímicas, trinta isolados de *Bacillus* spp., classificados em quatro espécies incluindo *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*.

### Antagonismo *in vitro*

Todos os cinco isolados de *B. subtilis* produziram uma zona de inibição quando confrontados com o *Fusarium* sp. (Figura 2).

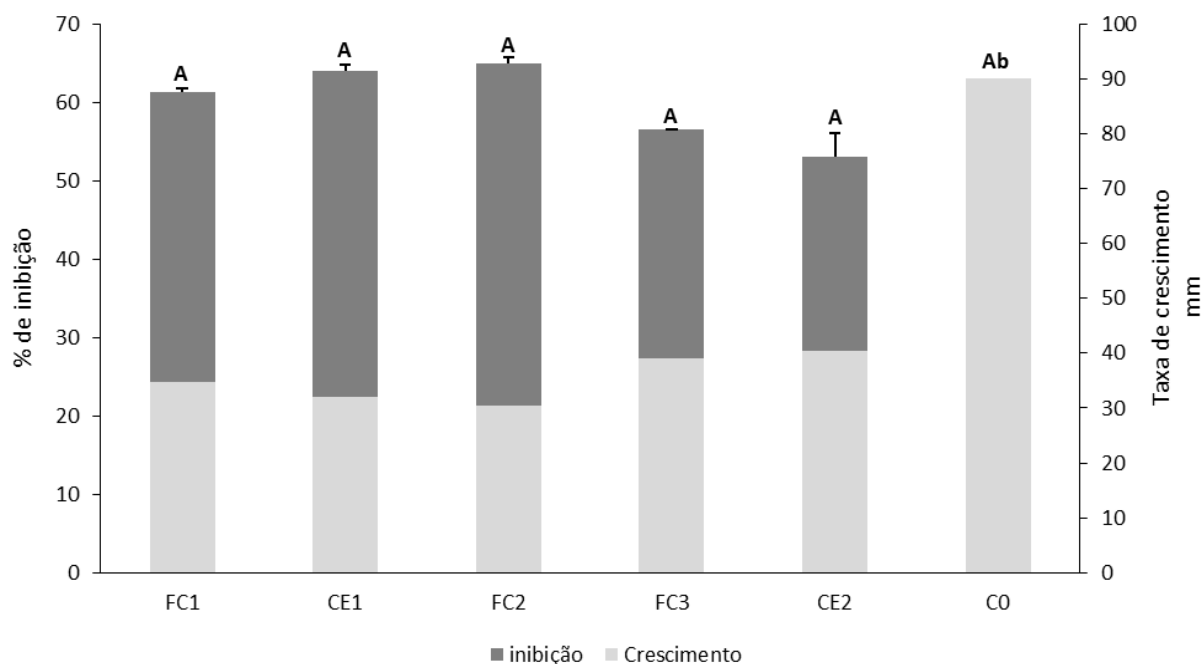
**Figura 2.** Inibição de crescimento micelial de *Fusarium* sp. (A) Controle; (B) Zona de inibição provocada pelo isolado FC1



Fonte: Autores, 2017.

Os isolados provocaram a inibição de 50–60% no crescimento de *Fusarium* sp. Pela análise de variância observou-se ausência de efeito estatisticamente significativo para a inibição entre os isolados. No entanto, quando comparado o efeito inibidor de cada isolado com o controle (C0), a taxa de crescimento do fungo foi drasticamente afetada (Figura 3). Entre as classes de compostos sintetizadas por *B. subtilis* que apresentam efeitos antifúngicos estão: bacilisin, fengicina e iturina (ARIZA & SANCHEZ, 2012). Estes metabólitos atuam no dano da superfície das hifas, induzindo a lise e extravasamento do conteúdo citoplasmático, que ocasiona à morte celular (ZHAO et al., 2014).

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos em estudo conduzido por Zhang et al. (2012), quando diferentes isolados de *B. subtilis* reduziram a incidência dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Verticillium dahliae* em plantas de morango. Estes autores relataram que a inoculação da rizobactéria além de inibir os fitopatógenos, estimulou o crescimento vegetal.

**Figura 3.** Porcentagem de inibição e taxa de crescimento micelial do *Fusarium* sp. na presença e ausência dos isolados de *B. subtilis*

Os valores representam as médias em triplicata  $\pm$  EP. Barras com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

**Fonte:** Autores, 2017.

A inoculação de *Bacillus* spp. visando promover o crescimento vegetal, tem sido reportada por mostrar aumentos significativos de produtividade na cultura do milho (KAVAMURA et al. 2013). Segundo Andreote et al., (2014), o microbioma associado à rizosfera desempenha serviços ecossistêmicos importantes na regulação fisiológica das plantas, através da biodisponibilização de nutrientes e no controle natural de organismos deletérios do rizoplano. Entre os mecanismos governados pelos microrganismos na regulação fisiológica das plantas são citados: promoção de crescimento vegetal através da síntese de fitohormônio; fixação biológica de nitrogênio; produção de sideróforos e solubilização de fosfato (SOUZA et al., 2015).

Schisler et al., (2004) relataram que os procedimentos de *screening* microbiano, incluindo isolamento, identificação e atividade de antagonismo, são considerados uma etapa crucial para desenvolvimento de produtos de controle biológico. Embora seja conhecido o potencial do *B. subtilis* como agente de biocontrole, poucos trabalhos de pesquisa são conduzidos com base na prospecção da bactéria. A demanda de registros e comercialização de produtos comerciais à base *Bacillus* spp. ainda é baixa (BETTIOL et al., 2012).



Segundo Bettiol & Morandi (2009), embora haja a existência de um acervo de contribuições técnico-científicas em controle biológico de pragas e patógenos, a política agrícola nacional ainda é incipiente em relação à expansão da comercialização de produtos de controle biológico. Entretanto, com a publicação do Decreto 6.913 de 23 de julho de 2009 o cenário agrícola atual pode sofrer modificações. Este documento permite o registro, de forma simplificada e priorizada, de produtos biológicos com uso aprovado para a agricultura orgânica (BRASIL, 2009).

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho de pesquisa permitem concluir que: (1) *B. subtilis* pode ser isolado tanto de solos do rizoplano do milho, quanto de solos do rizoplano de espécies vegetais nativas do Cerrado; (2) Os testes convencionais de identificação morfológica, estrutural e bioquímica, associados ao tratamento térmico das amostras foram eficiente no isolamento e identificação do *B. subtilis*; (3) Houve inibição do crescimento do fitopatógeno *Fusarium* sp. devido à ação antagonica *B. subtilis*, em meio de cultura.

Estes resultados reforçam a eficiência de *B. subtilis* como agente de biocontrole e subsidia, através de métodos clássicos, a bioprospecção da rizobactéria de solos agrícolas e sob vegetação nativa de Cerrado. Sugerimos estudos complementares para otimização de cultivo dos isolados e análise do antagonismo em condições de campo, visando o manejo efetivo para desenvolvimento de um produto de controle biológico à base de *B. subtilis*.

## REFERÊNCIAS

- AKTAR, M.W., SENGUPTA, D., CHOWDHURY, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**. 2 (1), 1–12.
- AMIN, M., RAKHISI, Z., AHMADY, A.Z., Isolation and Identification of Bacillus Species from Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**. 2015; 2(1):1-4.
- ANDREOTE F.D., GUMIERE T., DURRER A. (2014). Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agrícola**, 71(6): 528-539.
- ARIZA, Y., SANCHEZ, L. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. **Nova Bogotá**, v. 10, n. 18, p. 149-155, July 2012.

BALE J., VAN LENTEREN J., BIGLER F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 2008;363(1492):761-776. doi:10.1098/rstb.2007.2182.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna-SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. p.7- 14.

BETTIOL et al., (2012) Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas - Jaguariúna, SP: **Embrapa Meio Ambiente**, 155 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 88).

BRASIL. Decreto nº 6.913, de 23 de julho de 2009. Acresce dispositivos ao Decreto no 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 23 jul. 2009. Seção 1, p. 1.

BUCHANAN, R. I.; GIBBONS, N. G (1975). Bargey's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore: **The Williams & Wilkens**. 1268 p.

HENNING, A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. (EMBRAPA- Documentos 235). Londrina, **EMBRAPA-CNPS**, 2004, 51p.

KAVAMURA ET AL., (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research** 168: 183-191.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN, A.F., Manual de Fitopatologia, vol. 2, doenças das plantas cultivadas 4º ed., cap. 61, pag. 542, São Paulo: **Agronômicas Ceres**, 2005.

MELO, I.S. 1999. Isolamento de Agentes de biocontrole da rizosfera. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) Controle Biológico. v.3, ed. **Embrapa**, pp.15-55.

MOKBEL, A. A., 2013. Impact of Some Antagonistic Organisms in Controlling *Meloidogyne Arenaria* Infecting Tomato Plants. **Journal of Life Sciences and Technologies**. 1 (1): 69-73.

PRAÇA, Lílian Botelho et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidóptera, Coleóptera e Díptera. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, Jan. 2004 .

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

SANSINENA, E., ORTIZ, A., 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letter**., 33, 1523–1538.

SCHISLER, D. A., SLININGER, P. J., BEHLE, R. W., AND JACKSON, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**. 94:1267-1271.

SLEPECKY, R. A., HEMPHILL, H. E., (1992). The genus *Bacillus* nonmedical, in: A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K. Schleifer (Eds.), **The Prokaryotes**, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp. 1663–1689

SONENSHEIN, A.j.L., et al. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. **ASM Press**; 2002.

SOUZA, Rocheli de; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciane M.P.. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto , v. 38, n. 4, p. 401-419, Dec. 2015.

VIDA, J.B., ZAMBOLIM, L., TESSMANN, D.J., BRANDÃO FILHO, J.U.T., VERZIGNASSI, J.R. & CAIXETA, M.P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira** 29:355-372. 2004.

WHIPPS, J.M., (1987). Behaviour of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments. **Biochemical Journal**. 241: 835-845.

WHIPPS, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of experimental Botany**, 52:487–511.

ZHAO, Y., SELVARAJ, J.N., XING, F., ZHOU, L., WANG, Y., et al., 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. **PloS ONE** 9, e92486. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>.

ZHANG, Y, FAN, T, JIA, W, ZHANG, W, LIU, Q, LI, B, ZHANG, L (2012) Identification and characterization of a *Bacillus subtilis* strain TS06 as bio-control agent of strawberry replant disease (*Fusarium* and *Verticillium* wilts). **African Journal of Biotechnology** 11: pp. 570-580.