

AÇÃO ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillus* ssp. SOBRE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*¹

ODENILSON DE DEUS RIBEIRO LIMA^{2*}, LEONARDO DE JESUS MACHADO GOES DE OLIVEIRA², MÔNICA SHIRLEI BRASIL DOS SANTOS E SILVA², ANTONIA ALICE COSTA RODRIGUES³.

RESUMO – Objetivou-se avaliar o antagonismo e os metabólitos produzidos por diferentes espécies de *Bacillus* na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Para a avaliação do antagonismo de dez isolados de *Bacillus* ao patógeno, foi realizado o pareamento entre fungo e bactérias pelo método do círculo. Na qualidade dos metabólitos termo estáveis foram utilizados meio líquido BD (Batata-Dextrose) para crescimento dos isolados de *Bacillus* sp., permanecendo durante 15 dias em câmara incubadora. Em seguida, adicionou-se Ágar ao meio líquido, efetuando-se a autoclavagem e vertendo-se em placas de Petri. No centro das placas foram colocados discos de cultura do patógeno. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos e seis repetições para os dois experimentos. Foi verificado que todos os isolados diferiram da testemunha. Os isolados B 12 (*Bacillus* sp.), B 41 (*B. cereus*), B 22' (*B. pentothenicus*), B 45 (*B. cereus*), B 47 (*B. cereus*) apresentaram as menores médias de diâmetro da colônia. Na inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pela produção de metabólitos termoestáveis, cinco isolados diferiram da testemunha, são eles: B 35 (*B. pumilus*), B 47 (*B. cereus*), B 22' (*B. pentothenicus*), B 12 (*Bacillus* sp.) e B 41 (*B. cereus*), sendo os dois últimos tratamentos, os que apresentaram os menores diâmetros de colônia do fitopatógeno, com 2,89 e 3,81 cm, respectivamente. Os isolados B 12 e B 41 foram capazes de inibir 67,88 % e 57,66 % do *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Esses resultados ressaltam a possibilidade de utilização de bactérias do gênero *Bacillus* no combate à fusariose.

Palavras-Chave: *Solanum lycopersicon* L. Controle Biológico. Antagonismo. Fusariose.

IN VITROANTIFUNGAL ACTION OF *Bacillus* sp. ISOLATE ON *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

ABSTRACT - This study aimed to evaluate antagonism and metabolites produced by different species of *Bacillus* in the inhibition of mycelial growth *in vitro* against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. For evaluating the antagonism of *Bacillus* spp. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was performed pairing of fungus and bacteria by the method of the circle. In the method for detection for the quality for thermostable metabolites liquids. Media BD were used for growth of the isolated *Bacillus* sp. And incubated for 15 days. After this period, was added 3 g of agar in each flask, and autoclaved broth and poured into Petri dishes. In the center of the plates were placed discs culture of the pathogen. The experimental design was completely randomized with 11 treatments and six repetitions in both experiments. Statistical difference was found between the isolate and the control. Special mention to strains B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*B. cereus*), B22' (*B.pentothenicus*), B45 (*B. cereus*), B47 (*B. cereus*) that exhibited the lowest average diameter of the colony. To study the inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* by thermostatable metabolites five differ statistically from the control they are: B35 (*B. pumilus*), B47 (*B. cereus*), B22' (*B. pentothenicus*), B12 (*Bacillus* sp.) and B41 (*B. cereus*) the latter two treatments showed the best results of the pathogen colony diameters and 3.81 to 2.89 cm, respectively. B12 and B41 Isolates showed that their antibiotic products were able to inhibit 67.88 % and 57.66 % of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. These results highlight the possibility of using isolates of the genus *Bacillus* in the fight against fusarium wilt in tomato.

Keywords: *Solanum lycopersicon* L. Biological Control. Antagonism. Fusariose.

*Autor para Correspondência.

¹Recebido para publicação em 18/12/2012; aceito em 25/07/2014.

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia/Universidade Estadual do Maranhão.Cidade Universitária Paulo VI, S/N – Tirirical. CEP 65054-970, São Luís/MA, Brasil, denis_rlima@hotmail.com.

³Professora Adjunta da Universidade Estadual do Maranhão-Cidade Universitária Paulo VI, S/N – Tirirical. CEP 65054-970,São Luís/MA, Brasil.

INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) tem a sua origem na zona andina da América do Sul e pertence à família das Solanáceas. Destaca-se por sua importância econômica, sendo uma das oleráceas mais cultivadas no mundo (FAO, 2013).

Em 2013, o Brasil produziu 3.987.367 de toneladas desta hortaliça em 60.523 hectares de área plantada. A região Nordeste destaca-se como a quarta maior produtora do país com uma produção de 455.024 de toneladas. Dentre os estados do Nordeste, o Maranhão ocupa o 8º posição, com uma produção de 4.110 de toneladas, em 208 hectares de área plantada (IBGE, 2013).

A cultura do tomateiro é afetada por diversas doenças de importância econômica, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, virótica ou causada por nematóides. Entretanto, mais da metade das doenças infecciosas são causadas por fungos, sendo que estes podem infectar todos os órgãos das plantas. Dentre as doenças mais preocupantes estão aquelas causadas por fungos que atacam as plantas a partir do sistema radicular, destacando-se a fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen, que são agrupados em três raças. As raças 1 e 2 são amplamente distribuídas no mundo, e a raça 3 apresenta uma distribuição geográfica mais restrita (REIS, 2006).

A fusariose ocorre em todos os estados brasileiros, causando diversas perdas, entre elas, redução da colheita devido à morte prematura das plantas ou destruição de todas elas, assim como a diminuição da produtividade (JULIATTI, 2001).

O agente causal desta doença pode sobreviver no solo por longos períodos de tempo, sendo o controle químico e o cultural pouco efetivo, o que pode limitar o plantio de tomate em determinadas áreas (JONES, 1991; LOPES et al., 2003; REIS et al., 2004), aliado ao fato do patógeno ser habitante do solo e possuir a característica de formar clamidósporos, o que permite uma maior permanência no solo, dificultando assim o controle.

A deficiência de alternativa no controle da fusariose, associada às condições ambientais favoráveis ao fungo, inviabilizam o cultivo econômico do tomate no Estado do Maranhão, exigindo assim a importação desta hortaliça de outros estados. Tal situação, onera os custos ao produtor, diminuindo a acessibilidade da população a este produto bastante consumido pela sociedade, o que resulta em prejuízos, tanto para o produtor quanto para o consumidor, refletindo de forma negativa na cadeia produtiva.

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

(LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Diante do exposto, a utilização de microrganismos em sistemas agroecológicos tem sido cada vez mais empregado no controle biológico de doenças de plantas, e com a crescente preocupação da sociedade com o uso excessivo de agrotóxicos, contaminação da cadeia alimentar e a pouca eficiência do controle químico para a fusariose do tomateiro, objetivou-se nesse trabalho, avaliar o antagonismo de isolados de *Bacillus* pela sua ação direta e de seus metabólitos secundários sobre o agente causador da fusariose.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia localizado no Núcleo de Biotecnologia Agrônoma – NBA da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus de São Luís, durante o período de setembro de 2010 a agosto de 2012. Após a repicagem, os isolados foram submetidos à dois ensaios distintos que avaliaram a ação antagonística dos isolados de *Bacillus*.

Obtenção dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Bacillus* spp.

Foi utilizado um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e dez isolados de *Bacillus* spp. oriundos da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”, do Laboratório de Fitopatologia da UEMA, preservados em solo autoclavado e meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), respectivamente (Tabela 1). Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, posteriormente foram repicados e transferidos para tubos de ensaio para conservação de culturas puras.

Para a confirmação da patogenicidade, o isolado do patógeno foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, com antibiótico, e mantidas em condições ambiente, aproximadamente $26 \pm 0,5$ °C, por sete dias. Após esse período, foi adicionado 20 mL de água destilada em cada placa e utilizando-se uma lâmina de vidro, foi efetuada a raspagem das colônias, em seguida com o auxílio da câmara de Neubauer a suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹ e inoculada no sistema radicular, através de ferimentos nas raízes de dez plantas de tomateiro, cultivar Santa Cruz, com 30 dias de idade. A avaliação foi realizada 25 dias após à inoculação, efetuada através da incidência da fusariose.

Para o estudo do efeito antagonista de *Bacillus* spp. x *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, foi realizado um experimento *in vitro*, utilizando o método do círculo. Inicialmente, os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura BDA por 48 horas e o isolado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por sete dias, a $26 \pm 0,5$ °C, após este período de cultivo transferiu-se asépticamente para placas de

Petri com 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA, um disco de 6,0 mm de diâmetro com micélio do fitopatógeno, colocando-se no centro da placa. Com auxílio de uma alça de platina, inoculou-se a bactéria, na mesma placa formando um círculo com

diâmetro, aproximadamente de 5 cm, em torno do disco contendo o patógeno. Para o tratamento controle ou testemunha foi utilizado somente fitopatógeno cultivado em meio BDA, na mesma temperatura (MARIANO, 1993).

Tabela 1. Espécies e origem dos isolados de *Bacillus* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, preservados na Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva”. São Luís, 2012.

Isolados	Espécies	Origem	Procedência*
B35	<i>Bacillus pumilus</i>	Folhas de arroz	Pindaré - Mirim
B40	<i>Bacillus</i> sp.	Folhas de arroz	Grajaú
B16	<i>Bacillus macerans</i>	Folhas de arroz	Pindará-Mirim
B22	<i>Bacillus polymyxa</i>	Folhas de arroz	Arari
B47	<i>Bacillus cereus</i>	Folhas de arroz	Davinópolis
B45	<i>Bacillus cereus</i>	Folhas de arroz	Grajaú
B22'	<i>Bacillus pentothenicus</i>	Folhas de arroz	Arari
B41	<i>Bacillus cereus</i>	Folhas de arroz	Grajaú
B12	<i>Bacillus</i> spp.	Folhas de arroz	Arari
B25	<i>Bacillus pumilus</i>	Folhas de arroz	Arari
MGSS-	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Planta de Tomateiro	São Luís

* Municípios Maranhenses

A avaliação foi efetuada ao décimo dia, após o pareamento, pela inibição do crescimento micelial. Para isso foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e cinco repetições, sendo que cada placa consiste em uma unidade experimental.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) foi calculada pela fórmula de (MENTEN et al., 1976), onde:

$$PIC = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

Avaliação da produção de metabólitos termoestáveis mediados por *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

No método para detecção qualitativa de antibióticos (MDA), adaptado de Kupper et al. (2003), foram preparadas alíquotas de 200 ml de meio BD (Batata-Dextrose) em frascos de Erlenmeyer e colocados discos de meio BDA contendo a cultura da bactéria (*Bacillus* spp.), com sete dias de idade. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação,

a uma temperatura de $26 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo de 12 h claro contínuo. Após esse período, foram adicionadas 3 g de Ágar em cada frasco, e estes autoclavados por 20 minutos a 120° C, e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro. No centro das placas foram colocados discos de cultura de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mantidas por 15 dias a uma temperatura de $26 \pm 0,5$ °C, na presença de luz, em câmara incubadora.

A avaliação do potencial de antagonismo foi realizada ao décimo dia medindo-se em dois sentidos diametralmente opostos com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. Os diâmetros das colônias do patógeno foram comparados com a testemunha, cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA, sem a presença do caldo agarizado autoclavado. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e seis repetições.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela fórmula de (MENTEN et al., 1976), onde:

$$PIC = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro*.

No experimento baseado no método de círculo

lo através do antagonismo de 10 isolados de *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, aos 10 dias observou-se que todos mostraram efeito inibidor ao patógeno avaliado, ou seja, os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelo método do círculo por isolados de *Bacillus*. São Luís, 2012.

Tratamento	Diâmetro da colônia (cm)*	PIC (%)**
B35	6,90 b	11,53
B40	6,70 b	14,10
B16	6,60 b	15,38
B22	6,41 b	17,82
B47	4,57 cd	41,41
B45	4,49 cd	42,43
B22'	4,41 cd	43,46
B41	4,14 cd	46,92
B12	3,94 d	49,48
B25	4,79 c	38,58
Testemunha	7,80 a	-

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,5$) de significância. CV(%) = 6,64. T= testemunha; B 45, B 41, B 47= *B. cereus*; B 35, B 25= *B. pumilus*; B 16= *B. macerans*; B 22= *B. polymyxa*; B 22'= *B. pentothenticus*; B 12= *Bacillus* spp.; B 40= *Bacillus* sp.** PIC -Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial.

Os isolados B 12, B 41, B 22', B 45, B 47 e B 25 induziram as menores médias de diâmetro da colônia do patógeno. Os isolados B 35, B 40, B 16, B 22 diferiram estatisticamente da testemunha, porém as médias de crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foram maiores.

Supõe-se com base nos resultados, que os isolados podem ter agido de diferentes formas ou mecanismos de ação contra o *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* como produção de compostos voláteis, ácido cianídrico (HCN) e antibióticos, de forma isolada ou com todos esses mecanismos. Na literatura, menciona-se que o gênero *Bacillus* pode produzir todos esses produtos antagônicos como os encontrados por Vieira-Júnior (2005), que verificou no bioensaio *in vitro* que *B. cereus* (UFV-75) foi capaz de produzir sideróforos, compostos voláteis, bacteriocinas e enzima quitinase. É fato estabelecido que enzimas como quitinases, celulasas e glucanasas, sejam sintetizadas por microrganismos também como mecanismos de antagonismo (DUFFY, 2003) e que, em muitas situações, esse mecanismo pode explicar,

pelo menos em parte, o controle biológico de enfermidades de plantas promovido por alguns agentes procariontas.

É importante notar que dentre esses isolados, a presença da espécie de *Bacillus cereus* é marcante. Esta espécie tem sido descrita por vários autores como biocontroladora de doenças de plantas. Vieira-Júnior (2005) avaliando 500 isolados de procariontas residentes do filoplano do feijoeiro *in vitro*, constatou que o isolado UFV-75 (*Bacillus cereus*) foi capaz de inibir, a germinação de conídios e crescimento micelial de todos os patógenos testados. Já Nascimento (2009) no ensaio com dezoito isolados de *Bacillus* spp., no controle do crescimento micelial de *Pyricularia grisea*, observou a promoção da inibição do crescimento micelial de quinze isolados, aos quatorze dias, após o pareamento com destaque para os isolados B41 (*B. cereus*), B33 (*B. polymyxa*), BSB1 (*B. lentus*), B6 (*Bacillus* sp.) e B31 (*B. pumilus*).

O gênero *Bacillus* apresenta grande potencial de uso no controle biológico de diversos patógenos em diferentes culturas. Na cultura do milho, Shiomi

(2007) observando o antagonismo de bactérias endofíticas do milho como *B. subtilis* OG, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp. aos fungos de solo *Phytophthora aphanidermatum* (Eds.) Fitz., *Fusarium moniliforme* (Sheld.), *Rhizoctonia solani* (Kühn) e *Sclerotium rolfsii* Sacc., e ao patógeno *Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard & Suggs, constatou que, de forma geral, todos os isolados selecionados apresentaram atividade antagonista aos patógenos desafiantes, com destaque as bactérias *Bacillus subtilis* OG e *Bacillus lentimorbus*. Na cultura do mamoeiro, Paz (2010) investigando o efeito fungistático de nove isolados de *Bacillus* contra *Corynespora casicola* (Berk e Curt.) Wei., observou que o isolado de *Bacillus cereus* apresentou o melhor resultado na inibição do crescimento micelial, com 63,36 %, através do confronto no pareamento bactéria x fungo.

O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008). Assim, Melo (2005) em ensaio *in vitro*, com bactérias endofíticas de mandioca frente a *Phytophthora aphanidermatum* a fim de escolher as melhores linhagens de bactéria concluiu que o *B. pumilus* apresentou um potencial de biocontrole pelo confronto em meio agarizado. Em um segundo ensaio, foi adicionados outros dois patógenos, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, e como resultado desta avaliação, apresentaram melhores atividades antagonistas, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. antracis*. Estes resultados corroboram com os desta pesquisa, pois as espécies de *B. pumilus* e *B. cereus* presentes neste experimento também apresentaram atividade antagonista satisfatória.

O biocontrole ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi de 49,48 % de inibição do crescimento micelial pelo isolado B12 de *Bacillus* spp. Resultados semelhantes foram obtidos por Amorim; Melo (2002) quando estudaram a ação antagonista de rizobactérias contra dois fungos habitantes do solo, *Phytophthora icotiana* (= *parasitica*) Dastur e *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian, em citros nos quais sete isolados bacterianos apresentaram atividade antagonista à *Phytophthora* spp. dentre eles os mais significativos na inibição do crescimento micelial aos desafiantes, pertenciam ao gênero *Bacillus*. Acredita-se que os mecanismos de ação dessas rizobactérias em controlar os fitopatógenos estejam relacionados à produção de compostos tóxicos (antibiose) e de sideróforos (competição por ferro).

Diversos autores têm verificado o potencial antagonista de *Bacillus* com bons resultados de inibição ao crescimento dos fungos fitopatogênicos. Kupper et al. (2003) estudando 64 isolados de *Bacillus subtilis*, 4 isolados de *Bacillus* spp., e um isolado de *B. thuringiensis*, quanto a sua atividade antagonista contra *Colletotrichum acutatum* Simmonds, observaram que todos apresentaram efeito inibitório ao fun-

go avaliado. A mesma observação foi feita por Furlani et al. (2007), em que todos os isolados de *Bacillus* sp. promoveram inibição de crescimento micelial de *C. acutatum*, reforçando o potencial biocontrolador desse gênero de bactérias.

Foi constatado, também, que *Bacillus* obtidos de culturas diferentes das testadas, apresentaram resultados satisfatórios, como os encontrados por Pusey e Wilson (1984) em experimento com pós-colheita, no qual houve o controle da podridão parda em diversos tipos de frutas com a pulverização de isolados de *B. thuringiensis* e *B. subtilis*, o que mostra que microrganismos isolados de uma espécie de hospedeiro podem realizar, de maneira efetiva, controle de patógenos em diferentes espécies.

Avaliação da produção de metabólitos termooestáveis mediados por *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

No estudo da inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelos antibióticos secretados em caldo agarizado por dez isolados de *Bacillus* spp., cinco diferiram estatisticamente da testemunha são eles: B35, B47, B22', B12 e B4, sendo os dois últimos tratamentos que apresentaram os menores diâmetros de colônia do fitopatógeno, com 2,89 e 3,81 cm, respectivamente (Tabela 3). Esses resultados sugerem que os antibióticos presentes no caldo agarizado autoclavado são termooestáveis, ou seja, resistem a altas temperaturas sem perder as características antifúngicas, e que seu modo de antagonismo a outros microrganismos é principalmente a antibiose.

Resultados semelhantes obtiveram Santos et al. (1998), testando *B. subtilis* contra *Puccinia psidii* Winter, onde verificaram inibição de germinação de urediniosporos, tanto em caldo natural como autoclavado, considerando a termooestabilidade dos metabólitos produzidos por *B. subtilis*, independente da presença de células vivas.

Os isolados B12 e B41 mostraram que seus produtos antibióticos foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em 67,88 e 57,66 %, respectivamente. Em trabalho realizado por Rollemberg (2008), para detecção de compostos antifúngicos extracelulares termooestáveis, verificou-se que houve a produção de um composto com essas características contra *Colletotrichum gloesporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella cingulata*. Furlani et al. (2007) obtiveram resultados contrários aos desta pesquisa, na qual avaliando a inibição de crescimento de *Colletotrichum acutatum* em três condições diferentes, caldo bacteriano, caldo bacteriano filtrado, e caldo bacteriano filtrado e autoclavado com isolados de *B. subtilis*, não observou inibição ao crescimento do fitopatógeno em caldo autoclavado.

No entanto, observação contrária foi constatada por Kupper et al. (2009), investigando o efeito dos metabólitos termooestáveis produzidos por *B. subtilis* na germinação de *Colletotrichum acutatum*,

observaram que dos nove tratamentos de agente de controle, apenas um isolado de *B. subtilis* não produziu metabólitos tóxicos termoeestáveis em quantidades suficientes para inibir a germinação do patógeno. Em um estudo anterior, Kupper et al. (2003) avaliando 69 isolados de *Bacillus* spp., quanto à produção

de metabólitos, verificaram com exceção de dois isolados, que todos os outros tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha revelando que os metabólitos produzidos mostraram-se termoeestáveis e mantiveram suas atividades mesmo após autoclavagem.

Tabela 3. Médias da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* submetidos à produtos metabólitos de diferentes isolados de *Bacillus* spp. São Luís, 2012.

Tratamento	Diâmetro da Colônia* (cm)	PIC (%)**
B35	7.51 bc	16,55
B16	8.66 a	3,77
B22	8.91 a	1,00
B45	8.91 a	1,00
B40	8.66 a	3,77
B25	8.20 ab	8,88
B47	6.73 cd	25,22
B22'	6.15 d	31,66
B41	3.81 e	57,66
B12	2.89 e	67,88
Testemunha	9.00 a	0

*Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,5$) de significância. CV(%) = 6,91. T= testemunha; B45, B41, B47= *B. cereus*; B35, B25= *B. pumilus*; B16= *B. macerans*; B22= *B. polymyxa*; B22'= *B. pentothenicus*; B12= *Bacillus* spp.; B40= *Bacillus* sp.. ** PIC -Percentagem de Inibição do Crescimento Micelial.

Grande parte dos microrganismos envolvidos no controle biológico atua através de antibiose, onde ocorre a interação entre organismos, um metabólito produzido por um deles tem um efeito prejudicial sobre o outro. A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular e independe do contato físico entre os microrganismos (BETTIOL; GHINI, 1995), dessa forma, a busca por microrganismos antagonísticos a fungos fitopatogênicos tem aumentado (BENITEZ et al., 2004). Diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos, podendo secretar metabólitos comercialmente importantes, como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas (BETTIOL; GHINI, 1995).

Gomes et al. (2001) selecionando e avaliando antagonistas para o controle biológico da pinta-preta causada por *Cylindrocladium spathulatum* El-Gholl, observou a produção de metabólitos por três isolados, sendo dois deles pertencentes ao gênero *Bacillus*, já os outros isolados pesquisados estimularam o crescimento do patógeno.

Os resultados desses experimentos dão indi-

cios de que os isolados B12 (*Bacillus* sp.), B41 (*B. cereus*) possam ser utilizados em experimentos de campo, devido à suas propriedades antifúngicas já constadas contra *Corynespora cassiicola* (PAZ, 2010), *Pyricularia grisea* (NASCIMENTO, 2009), e contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

CONCLUSÃO

As espécies de *Bacillus* avaliadas neste estudo apresentaram potencial para inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, tanto pelo método do círculo, quanto pela produção de metabólitos termoeestáveis, sendo a antibiose seu principal mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e

- Phytophthora citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.
- BENITEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiologia*, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. Princípios e Conceitos. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.
- DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 501-538, 2003.
- FAO (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em 22 fev. 2013.
- FURLANI, A. C. F. A. et al. Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*. **Científica**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 196-200, 2007.
- GOMES, N. S. B.; JÚNIOR, A. G.; AUER, C. G.; Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 43, n.43, p. 123-138, 2001.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). SIDRA. **Tomate**. Produtividade de 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 21 jul. 2013.
- JONES, J. P. *Fusarium* wilt. In: JONES, J. B.; JONES, J. P., et al (Ed.). **Compendium of tomato disease**. St. Paul: APS Press, 1991. p. 15.
- JULIATTI, F. C. Manejo integrado de fungos fitopatogênicos. In: SILVA, L. H. C. da P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. de A. **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p. 159- 220.
- KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.
- KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. de. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.
- 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.
- LOPES, C. A.; REIS, A.; ÁVILA, A. C. de. Doenças do tomateiro para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 24. n. 219, p. 66-78, 2003.
- 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.
- MELO, F. M. P. **Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a**. 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- NASCIMENTO, I. O. **Isolamento, identificação e seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de fitopatógenos do arroz**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2009.
- PAZ, D. S. da. **Ação inibitória de extratos vegetais, óleo de nim, produtos abióticos e *Bacillus* sobre *Corynespora casicola*, agente da mancha-alvo do mamoeiro**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2010.
- PUSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 9, p. 753-756, 1984.
- REIS, A. et al. **Estabelecimento e caracterização a nível de raça de uma coleção de isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. Brasília : Embrapa Hortaliças, 2006, 14 p.
- REIS, A et al. **Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004, 35 p.

ROLLEMBERG, C. L. **Mancha das folhas da macieira: Caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes do filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas.** 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SANTOS, C. F. C. et al. Sensibilidade *in vitro* de uredinósporos de *Puccinia psidii* a *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 183-185, 1998.

SHIOMI, H. F. **Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras de crescimento de plantas de milho (*Zea mays*).** 2007. 57 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu- SP, 2007.

VIEIRA JUNIOR, J. R. **Procariotas residentes do filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura.** 2005. 146 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

TENDULKAR, S. R. et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on Phytopathogen Magnaporthe grisea. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p. 2331-2339, 2007.

YAO, A. et al. Effect of FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 30, p. 323-328. 2006.