

Nota Científica

Atividade de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. como bioagentes de controle de *Colletotrichum acutatum*

Activity of cells, filtered and autoclaved bacterial broth of *Bacillus* spp. as biological control agents of *Colletotrichum acutatum*

Ana Caroline Ferreira Athayde FURLANI¹, Margarete CAMARGO³, Rita de Cássia PANIZZI³, Carolina Fonseca PEREIRA^{2,3}

¹Bolsista CAPES do programa de pós-graduação em Produção e Tecnologia de Sementes -anacarol@fcav.unesp.br

²Bolsista CNPq do programa de pós-graduação em Produção e Tecnologia de Sementes

³Departamento de Fitossanidade – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – 14884-900 – Jaboticabal – SP

Resumo

A utilização de agentes de controle biológico tem sido estudada em diversas culturas, mostrando-se um método promissor no combate às doenças de plantas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* o antagonismo entre isolados de *Bacillus* spp. e *Colletotrichum acutatum*. Para tanto, analisaram-se a influência de células, filtrado e autoclavado na inibição da germinação de conídios e o desenvolvimento micelial de *C. acutatum*. Dez isolados bacterianos, agentes de controle biológico, foram testados quanto ao antagonismo a um isolado de *C. acutatum*. Os isolados que mais se destacaram como antagonistas foram utilizados para o preparo de caldos bacterianos, sendo que parte destes foi mantida intacta, parte filtrada em membrana Millipore® e outra parte autoclavada. Foram instalados três ensaios para verificar a ação dos isolados no crescimento micelial do fungo, no desenvolvimento de colônias e o efeito na germinação de conídios. Os isolados de *Bacillus* spp. foram capazes de produzir metabólitos em quantidade suficiente para inibir a germinação e o crescimento micelial do fitopatógeno, porém, no tratamento submetido a alta temperatura (caldo autoclavado), não houve efeito sobre o fungo, o que leva a crer que o metabólito produzido pela bactéria em estudo é termolábil.

Palavras-chave adicionais: controle biológico; metabólitos; antagonismo.

Abstract

The utilization of biological control agents has been studied in many crop species, having been found to be a promising method in plant diseases control. The present study aimed to evaluate "*in vitro*" antagonism between *Bacillus* spp. isolates and *Colletotrichum acutatum*. For this purpose, it was analyzed the influence of cells, filtered and autoclaved as inhibitors of *C. acutatum* conidial germination and mycelium growth. Ten bacterial isolates from biological control agents were tested for antagonism to one *C. acutatum* isolate. The isolates that showed the highest levels of antagonism were utilized to prepare a bacterial broth of each one. Part of this was maintained intact, a second part was filtered in Millipore® membrane and the last one was autoclaved. Three essays were set to verify the action of isolates on mycelium growth, colony development, and the effect on conidial germination. *Bacillus* spp. isolates were able to produce metabolites in sufficient amount to inhibit the germination and mycelium growth of the plant pathogen. However, in the treatment subjected to high temperature (autoclaved broth), no effect on the fungus was verified, this being understood as an indication that the metabolites produced by the bacterium are thermolabiles.

Additional keywords: biological control; metabolites; antagonism.

Introdução

A flor preta do morangueiro, causada por *Colletotrichum acutatum* Simmonds, é uma das doenças mais destrutivas da cultura. Encontra-se largamente distribuída em todas as regiões

produtoras, podendo tornar-se limitante em virtude da suscetibilidade das cultivares utilizadas e da ineficiência das medidas de controle com fungicidas (TANAKA et al., 1997; FREEMAN et al., 2002). Além disso, as práticas culturais como "mulching" e irrigação por asper-

são favorecem extremamente a doença (TANAKA et al., 1997).

Tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico, o controle biológico vem despertando interesse dos pesquisadores, sendo as espécies de *Bacillus* destacadas como uma boa alternativa para o controle de vários fitopatógenos em diversas culturas (BAKER et al., 1983; BAKER et al., 1985; RYTTER et al., 1989; BETTIOL & KIMATI, 1990; LAZARETTI et al., 1995; YOSHIDA et al., 2001). Isso se deve ao fato de apresentar diversas vantagens, como a rapidez com que se desenvolve em meio de cultura e na natureza, a produção de endósporo altamente resistente às condições adversas, o crescimento em ampla faixa de temperatura, a adaptação a várias condições ambientais e a produção de inúmeros antibióticos (LAZARETTI et al., 1995). O biocontrole pode ainda oferecer solução viável para fitomoléstias consideradas de difícil controle pelos processos convencionais, como o químico (ROBBS, 1986).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar *in vitro* o antagonismo entre isolados de *Bacillus* spp. e *C. acutatum* e verificar a influência de células, filtrado e autoclavado na inibição da germinação de conídios e o desenvolvimento micelial do fungo.

Material e métodos

Obtenção de *C. acutatum* e *Bacillus* spp.

O isolado de *C. acutatum* foi obtido de flores de morangueiro e pertence à coleção do Laboratório de Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

Os isolados de bactérias B1, B2, B5, B6, B9, B10, B11 e B13 foram provenientes de morangueiro; o isolado ACB-80, de citros, e o isolado ATM, de atemóia. Estes foram conservados em tubo contendo meio BDA inclinado, coberto com óleo mineral esterilizado.

Teste de antagonismo de *Bacillus* spp. a *C. acutatum*

Utilizou-se o método do pareamento. As bactérias foram cultivadas em meio BDA, sendo utilizadas no ensaio após 48 horas de incubação à temperatura ambiente.

Um disco de 5 mm de diâmetro foi retirado da borda de uma colônia ativa de *C. acutatum* e colocado no centro de placas de Petri contendo meio BDA. Quatro alçadas da mesma suspensão bacteriana foram colocadas ao redor do disco. A testemunha constou apenas do disco do isolado do fungo no centro da placa, sem a suspensão bacteriana. O experimento foi avaliado após dez dias de incubação à temperatura ambiente, sendo medido o diâmetro da colônia

de *C. acutatum* para cada tratamento. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Preparo do caldo bacteriano

A partir desta etapa, os procedimentos foram realizados para três isolados bacterianos, sendo ATM e B9 os que mais se destacaram no teste de antagonismo descrito acima, e ACB-80, por ser eficiente no controle da flor preta do morangueiro de acordo com COSTA (2001).

Foi preparado um caldo bacteriano, tomando-se uma alçada da cultura da bactéria cultivada em BDA, e introduzindo-a em um erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido BD (batata e dextrose). Foram preparados seis erlenmeyers por isolado, sendo estes submetidos à agitação mecânica, no escuro, a 28 °C, por 48 horas (ATHAYDE, 2002).

Influência de células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. na inibição do crescimento micelial de *C. acutatum*

Dos seis erlenmeyers, dois foram utilizados como inicialmente preparados (caldo bacteriano), dois foram autoclavados e dois foram filtrados em membrana Millipore com malha de 0,22 µm. De cada um destes, 25 mL foram misturados a 225 mL de meio BDA fundente. Os tratamentos constaram de: 225 mL de meio BDA fundente + 25 mL de caldo bacteriano; 225 mL de meio BDA fundente + 25 mL de caldo bacteriano autoclavado; 225 mL de meio BDA fundente + 25 mL de caldo bacteriano filtrado, e a testemunha constou de 250 mL de meio BDA. O conteúdo de cada frasco foi vertido em placas de Petri, e após solidificação do meio, foi adicionado ao centro um disco de 5 mm de diâmetro, retirado da borda de uma colônia jovem de *C. acutatum* com auxílio de um vazador. A incubação foi feita em temperatura ambiente e iluminação contínua. O ensaio foi avaliado quando a colônia do tratamento-testemunha atingiu a borda da placa de Petri. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x3 (três bactérias e três tipos de caldo), com cinco repetições. Para análise estatística, os dados originais foram calculados em porcentagem do crescimento em relação ao da testemunha e transformados em $\arcsen \sqrt{(x+1)}$.

Influência das células, filtrado e autoclavado de *Bacillus* spp. na germinação de conídios de *C. acutatum*

Foram utilizados os mesmos tratamentos acima descritos. Os meios de cultura correspondentes a cada tratamento foram vertidos em placas de Petri e, após solidificarem, foi adicionado 0,1 mL de suspensão do fungo na

concentração de 1×10^3 conídios.mL⁻¹, a qual foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski. A incubação foi feita em temperatura ambiente e iluminação contínua. O ensaio foi avaliado após 24 horas, observando se havia desenvolvimento de colônias do fungo. Foram feitas cinco repetições de cada tratamento.

Outro teste foi feito para se verificar a influência das bactérias na germinação dos conídios do fungo. Para isso, marcou-se, na face inferior de lâminas de microscopia, uma área de 10 mm de diâmetro. Na face superior, foram vertidos 4mL de meio ágar-água e, após solidificação, adicionou-se 0,1 mL do conteúdo de cada tratamento (caldo bacteriano, caldo bacteriano autoclavado e caldo bacteriano filtrado); em seguida, adicionou-se 0,1 mL da suspensão do fungo na concentração de 1×10^3 conídios mL⁻¹ no centro de cada círculo marcado.

A testemunha constou da adição apenas da suspensão do fungo. Foram preparadas 18 repetições para cada tratamento, e após 14 horas de incubação à temperatura ambiente, foram colocadas gotas de corante lactofenol azul para contagem de conídios germinados em microscópio ótico com 100 vezes de aumento. Foram considerados germinados os que apresentaram tubo germinativo com o dobro do comprimento do conídio. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x3 (três bactérias e três tipos de caldo) e dezoito repetições por tratamento. Para análise estatística, os dados originais foram calculados em porcentagem de germinação em relação à da testemunha e transformados em $\text{arc-sen} \sqrt{(x + 1)}$.

Resultados e discussão

Todos os isolados bacterianos promoveram inibição de *C. acutatum*, cujo crescimento não diferiu significativamente na presença dos vários isolados (variou de 0,77 a 2,33 cm), mas diferiu significativamente da testemunha (6,10 cm). Os isolados ATM e B9 foram os que promoveram maior inibição do crescimento do fungo, cuja colônia apresentou diâmetros de 0,77 e 0,87, respectivamente. COSTA (2001) obteve resultados satisfatórios no controle biológico da flor pre-ta do morangueiro com isolados de *Bacillus* spp. obtidos de citros, o que mostra que microrganismos isolados de uma espécie de hospedeiro podem realizar, de maneira efetiva, controle de patógenos em diferentes espécies.

O crescimento micelial do fitopatógeno nas placas que receberam o caldo bacteriano e o caldo bacteriano filtrado, dos três isolados de *Bacillus* spp., foi mínimo, diferindo daquelas que receberam o caldo bacteriano autoclavado (Tabela 1). Tal resultado indica que os metabólitos produzidos por estes isolados da bactéria são termolábeis. Os

dados não concordam com os de MORETTO (2000) que, estudando isolados de *Bacillus* spp. obtidos de citros, verificou que estes mantiveram suas atividades mesmo após autoclavagem. Testando isolados de *Bacillus subtilis* obtidos do solo contra *Colletotrichum graminicola*, MICHEREFF et al. (1994) determinaram que os metabólitos oriundos da bactéria eram termoestáveis, difusíveis, não-voláteis e inibiram o crescimento do fungo. Assim, estes resultados sugerem que isolados de *Bacillus* spp. podem produzir metabólitos com propriedades e talvez modos de ação diferentes. Como pode ser observado na Tabela 1, os crescimentos miceliais médios do fungo, nos tratamentos com os três isolados de *Bacillus* spp., não apresentaram diferença significativa. O tratamento com o caldo auto-clavado não afetou o desenvolvimento do micélio, tendo este o desenvolvimento igual ao da testemunha.

A utilização de filtrado de cultura bacteriana foi altamente eficiente para inibir o crescimento micelial do fungo. YOSHIDA et al. (2001) trabalharam com filtrado de *B. amyloliquefaciens* no controle de *Colletotrichum dematium*, tendo verificado a inibição dos sintomas de antracnose em folhas de amoreira tratadas com diferentes concentrações do filtrado antes e simultaneamente à inoculação do agente causal.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados do desenvolvimento de colônias de *C. acutatum* a partir de conídios semeados em BDA. Observou-se, que nas placas contendo o caldo bacteriano, assim como o filtrado deste caldo, não houve formação de colônias, enquanto no caldo autoclavado o resultado foi semelhante ao da testemunha, sugerindo que os produtos metabólitos produzidos pelas bactérias são termolábeis.

Na germinação de conídios observada em lâminas, verificou-se que a adição do caldo bacteriano promoveu maior redução da quantidade de esporos germinados. Com exceção do isolado bacteriano ACB-80, não houve diferença significativa na germinação de esporos nos meios contendo caldo bacteriano filtrado e caldo bacteriano autoclavado, como pode ser visto na Tabela 1, contrastando com a germinação observada na formação de colônias no ensaio anterior.

YOSHIDA et al. (2001) verificaram que a germinação de conídios de *C. dematium* foi completamente inibida em folhas de amoreira tratadas com filtrado de cultura de *B. amyloliquefaciens*. Provavelmente, a bactéria não inibe inicialmente a germinação de conídios, mas logo após interrompe o desenvolvimento das hifas. PARBERY (1981) e ROBBS (1986) relataram que certos *Bacillus* spp. apresentavam ação lítica às paredes de esporos em diversos estádios de agentes de ferrugens.

Tabela 1 - Crescimento micelial, formação de colônias e germinação de conídios de *Colletotrichum acutatum* em meio de cultura com a adição de caldo bacteriano, caldo bacteriano filtrado e caldo bacteriano autoclavado de isolados de *Bacillus* spp.

Table 1 – Mycelium growth, colony formation and conidial germination of *Colletotrichum acutatum* in culture media with addition of bacterial broth, filtered bacterial broth and autoclaved bacterial broth of *Bacillus* spp isolates.

Tratamento/ Treatment	Isolado/ Isolate			Média/Mean
	ATM	B9	ACB-80	
Crescimento micelial (%) ^{1, 2, 3/} Mycelial growth (%) ^{1, 2, 3}				
Caldo bacteriano/ Bacterial broth	5,74	5,74	5,74	5,74b
Caldo bacteriano filtrado/ Filtered bacterial broth	5,74	5,74	5,74	5,74b
Caldo bacteriano autoclavado/ Autoclaved bacterial broth	73,16	65,79	73,27	70,74a
Média/ Mean	28,81A	25,26A	28,25A	-
Número de colônias formadas/ Number of colonies formed				
Caldo bacteriano/ Bacterial broth	0	0	0	-
Caldo bacteriano filtrado/ Filtered bacterial broth	0	0	0	-
Caldo bacteriano autoclavado/ Autoclaved bacterial broth	>300	>300	61	-
Testemunha/ Control	>300	>300	>300	-
Germinação de conídios (%) ^{1, 4, 5/} Conidial germination (%) ^{1, 4, 5}				
Caldo bacteriano/ Bacterial broth	26,48bA	22,85bA	39,94bA	29,76b
Caldo bacteriano filtrado/ Filtered bacterial broth	57,35aA	41,76aA	43,43bA	47,51a
Caldo bacteriano autoclavado/ Autoclaved bacterial broth	40,42abA	33,60abB	73,60aA	49,20a
Média/ Mean	41,41B	32,73A	52,32B	-

¹ Média de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey. ² C.V. (%) = 28,93; DMS = 7,08. ³ Dados originais calculados em porcentagem do crescimento em relação ao da testemunha e transformados em $\text{arc-sen} \sqrt{(x+1)}$. ⁴ C.V. (%) = 36,19; DMS = 17,22; DMS para médias de tratamentos e isolados = 9,94. ⁵ Dados originais calculados em porcentagem de germinação em relação à da testemunha e transformados em $\text{arc-sen} \sqrt{(x+1)}$.

¹ Mean of five repetitions. Means in the same column followed by the same small case letter and those in the same line followed by the same large case letter are not significantly different at the 5% level of probability according to the Tukey test. ² C.V. (%) = 28,93; DMS = 7,08. ³ Original data calculated in percentage of growth in relation to the control and transformed in $\text{arc-sen} \sqrt{(x+1)}$. ⁴ C.V. (%) = 36,19; DMS = 17,22; DMS for means of treatments and isolates = 9,94. ⁵ Original data calculated in percentage of germination in relation to the control and transformed in $\text{arc-sen} \sqrt{(x+1)}$.

The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth

Conclusões

O caldo bacteriano e o caldo bacteriano filtrado são os tratamentos mais eficientes, pois inibem o crescimento micelial, a produção de colônias e a germinação de conídios de *C. acutatum*.

Referências

ATHAYDE, A.C.F. **Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio líquido e desenvolvimento em diferentes substratos**. 2002. 30f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Bio-control of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, St Paul, v.69, n.9, p.770-772, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, St Paul, v.73, n.8, p.1.148-1.152, 1983.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.8, p.1.165-1.174, 1990.
- 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.
- FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Survival and host specificity of *Colletotrichum acutatum* from strawberry. **Acta Horticulture, Wagenengen**, v.567, p.619-621, 2002.
- LAZARETTI, E.; MENTEN, J.O.M.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de trigo com *Bacillus subtilis* para o controle de *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris sorokiniana* e *Alternaria tenuis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.21, n.2, p.163-167, 1995.
- MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, N.S.S.; MARIANO, R.L.R. Antagonismo de bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.4, p.541-545, 1994.
- MORETTO, K.C.K. **Controle biológico da queda prematura dos frutos cítricos causada por *Colletotrichum acutatum***. 2000. 128f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- PARBERY, D.G. Biology of anthracnoses on leaf surfaces. In: BLAKEMAN, J.P. (Ed.) **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academy Press, 1981. 502p.
- ROBBS, C.F. Potencialidade de bactérias no biocontrole de doenças de plantas. In: 1, 1986, Campinas. **Anais...** p.17-23.
- RYTTER, J.L.; LUKEZIE, R.; CRAIG, R.; MOORMAN, W. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St Paul, v.79, n.3, p.367-370, 1989.
- TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.556-571.
- YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, K.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, St Paul, v.91, n.2, p.181-187, 2001.

Recebido em 09-02-2006

Aceito para publicação em 02-03-2007