



Efeito de Isolados Bacterianos no Biocontrole '*in vitro*' de *Aspergillus* sp.

Effect of the Isolated Bacteria in the Biocontrol '*in vitro*' of *Aspergillus* sp.

S. VALIATI¹; E. FERRARI¹; H.F. SHIOM¹

¹ Universidade Federal de Mato Grosso – Campus de Sinop
+ Autor correspondente: s_valiati@hotmail.com

Resumo

Verificou-se em laboratório o efeito de sete isolados bacterianos sobre o crescimento micelial de *Aspergillus* sp. '*in vitro*', a partir do método de "culturas pareadas". O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com oito tratamentos: T1 – Testemunha (Solução salina 0,85%), T2 – BB1 (*Bacillus alcalophilus*), T3 – BS3 (*Photorhabdus luminescens*), T4 – BB4 (*Bacillus cereus* GC. sub grupo B), T5 – BB5 (*Stenotrophomonas maltophilia*), T6 – BB6 (*Yersinia bercovieri*), T7 – BS5 (*Bacillus cereus* GC. sub grupo B) e T8 – BS6 (*Bacillus cereus* GC. sub grupo B) e três repetições cada. Avaliou-se o diâmetro do micélio do patógeno (cm) nos tratamentos com isolados quando a testemunha atingiu as extremidades da placa de Petri. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, através do software estatístico ESTAT e as diferenças entre médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Foi observado que os isolados bacterianos BB1, BB4, BB5, BS5 e BS6 não apresentaram nenhum efeito no controle do patógeno, igualando-se à testemunha. O tratamento com o isolado BS3 apresentou 7,8 cm de diâmetro, sendo considerado estatisticamente igual aos tratamentos sem efeito e ao melhor tratamento. No tratamento com o isolado BS6 o micélio do patógeno apresentou o menor valor, 6,03 cm, sendo estatisticamente superior aos demais.

Unitermos: controle biológico, pós-colheita, micotoxinas, amendoim.

Abstract

It was found in the laboratory the effect of seven bacterial isolates on mycelial growth of *Aspergillus* sp. '*in vitro*', by the method of "paired cultures". The experimental design was a completely randomized design with eight treatments: T1 - control (saline 0.85%), T2 - BB1 (*B. alcalophilus*), T3 - BS3 (*P. luminescens*), T4 - BB4 (*B. cereus* GC. subgroup B), T5 - BB5 (*S. maltophilia*), T6 - BB6 (*Y. bercovieri*), T7 - BS5 (*B. cereus* GC. subgroup B) and T8 - BS6 (*B. cereus* GC. subgroup B) and three repetitions each. Was evaluated the diameter of the pathogen mycelial (cm) in the isolates treatments when control has reached the ends of the Petri dish. The data collected were subjected to analysis of variance by F test, using the statistical software ESTAT and the differences between means were compared by Tukey test at 5% probability. It was observed that the bacterial isolates BB1, BB4, BB5, BS5 and BS6 had no effect on pathogen control, matching the witness. Treatment with isolated BS3 showed 7.8 cm in diameter, was considered statistically equal to ineffective treatments and the best treatment. In dealing with isolated BS6 the mycelium of the pathogen had the lowest value, 6.03 cm, which was statistically superior to the others.

Keywords: biological control, post-harvest, mycotoxins, peanut.

Introdução

Os fungos do gênero *Aspergillus* causam a podridão de *Aspergillus* (Reis, 2009) e se caracterizam por colonizarem substratos como frutos e sementes e produzirem micotoxinas que são prejudiciais à saúde do ser humano (Dhingra & Coelho Netto, 1998). Sua presença em sementes como de amendoim, pode afetar o vigor e o rendimento da planta em campo, quando estas forem utilizadas para fins de semeadura (Luz, 2003).

O controle deste patógeno na fase de pós-colheita tem sido feito utilizando-se produtos com propriedades fungitóxicas, como o benomyl (Vanzolini et al., 2000). Mas também há relatos na literatura de alguns produtos biológicos, como o extrato de alho (Bilgrami et al., 1992) e o óleo essencial de capim limão (Mishra & Dubey, 1994).

Por definição, o controle biológico de doenças consiste basicamente na utilização de organismos que ataquem direta ou indiretamente outros que estejam causando dano econômico (Janisiewicz et al., 2002). Muitos trabalhos já demonstraram que a utilização desse método apresenta resultados satisfatórios, levando à utilização de microorganismos como fungos, leveduras e bactérias no controle de doenças pós-colheita por vários pesquisadores (Melo et al., 1995; Sanhueza, 1998; Bettiol & Morandi, 2009).

Atualmente, a maioria dos produtos disponíveis no mercado para o controle biológico é à base de bactérias. Essa preferência é atribuída à maior facilidade de produção em massa, à estabilidade das formulações e a aspectos referentes ao modo de ação (Glare & O' Callaghan, 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo verificar se as bactérias *P. luminescens*, *B. cereus* Gc. subgrupo B, *B. alcalophilus*, *Y. bercovieri* e *S. maltophilia*, isoladas de biofertilizantes à base de esterco bovino e suíno apresentam potencial para controle de *Aspergillus* sp. 'in vitro'.

Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop/MT (11°50'53" Sul e 55°38'57" Oeste) a uma altitude de 384 metros; durante os meses de junho e julho de 2012.

Foram realizados 8 tratamentos: T1 – Testemunha (Solução salina 0,85%), T2 – BB1 (*B. alcalophilus*), T3 – BS3 (*P. luminescens*), T4 – BB4 (*B. cereus* GC. sub grupo B), T5 – BB5 (*S. maltophilia*), T6 – BB6 (*Y. bercovieri*), T7 – BS5 (*B. cereus* GC. sub grupo B) e T8 – BS6 (*B. cereus* GC. sub grupo B) com três repetições cada (placas) em delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Os isolados bacterianos foram provenientes de uma seleção massal realizada em biofertilizantes à base de esterco bovino e suíno, sendo quatro de origem bovina (BB1, BB4, BB5 e BB6) e três de origem suína (BS3, BS5 e BS6).

Discos de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de *Aspergillus* sp. foram transferidos para a extremidade de placas de Petri com 8 cm de diâmetro, contendo meio BDA, a 1,5 cm da borda. Na extremidade equidistante da mesma placa o isolado bacteriano foi colocado na forma de risca, com auxílio de uma alça de Drigalsky – também à 1,5 cm da borda. Na testemunha foi colocada solução salina (0,85%).

As placas foram mantidas no laboratório, em fotoperíodo de 12 horas a 25°C ± 2°C. Quando o micélio do patógeno presente no tratamento testemunha atingiu a extremidade da placa, mediu-se o diâmetro do micélio (cm) nos tratamentos com os isolados bacterianos.

Os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico "ESTAT".

Resultados e Discussão

De acordo com as análises, foram obtidos efeitos significativos no diâmetro

do micélio de *Aspergillus* sp. ($P < 0,05$) para os diferentes tratamentos (Tabela 1).

Os isolados bacterianos BB1, BB4, BB5, BS5 e BS6 não apresentaram nenhum efeito no controle do patógeno. Sendo assim, não houve diferença significativa entre esses valores e os obtidos pela testemunha, com 8 cm de diâmetro.

O micélio do patógeno no tratamento com o isolado BS3 (*P. luminescens*) apresentou 7,8 cm de diâmetro, sendo considerado estatisticamente igual aos tratamentos sem efeito e ao melhor tratamento.

Já no tratamento com o isolado BS6 (*Y. bercovieri*) o micélio do patógeno apresentou 6,03 cm, sendo estatisticamente superior aos demais e representando uma inibição de 25% no crescimento 'in vitro' de *Aspergillus* sp.

Santos et al. (2012), em trabalho realizado com mofo branco (*S. sclerotiorum*) verificaram que as bactérias *P. luminescens*, *B. cereus* GC subgrupo B, *B. alcalophilus* e *Y. bercovieri* apresentaram taxas de inibição desse patógeno variando entre 31% e 46%.

Tabela 1. Diâmetro do micélio (cm) de *Aspergillus* sp. 'in vitro', a partir de tratamentos com isolados bacterianos comparados à testemunha. UFMT, Sinop/MT, 2012*.

| Tratamento | Diâmetro do micélio |
|-------------|---------------------|
| Testemunha | 8,0 a |
| BB1 | 8,0 a |
| BB4 | 8,0 a |
| BB5 | 8,0 a |
| BB6 | 6,03 b |
| BS3 | 7,8 ab |
| BS5 | 8,0 a |
| BS6 | 8,0 a |
| Média geral | 7,73 |
| CV (%) | 8,11 |
| Erro padrão | 0,36 |
| DMS | 1,77 |

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

Embora as bactérias da espécie *B. cereus* sejam capazes de produzir uma variedade de metabólitos patogênicos, a virulência desses metabólitos ainda não foi completamente elucidada (Martínez-Blanch et al., 2009) e neste trabalho não foi observada sua eficiência.

Para *S. maltophilia* já existem relatos de eficiência no controle de patógenos de plantas (Berg et al., 1999) devido à produção de quitinase (Yadav et al., 2007). Porém, também não foi verificado potencial de controle desta bactéria sobre *Aspergillus* sp. 'in vitro'.

As bactérias que apresentaram eficiência no controle do patógeno são caracterizadas por produzirem toxinas (Bettiol & Morandi, 2009). O gênero *Yersinia* é capaz de produzir toxinas termoestáveis

e possuem alto nível de atividade lipolítica (Filho, 2006). Já *P. luminescens*, em estudo realizado por Bowen & Ensign, (1998) demonstrou a produção de complexos tóxicos de peso molecular elevado.

Conclusão

Os isolados bacterianos *P. luminescens* e *Y. bercovieri* foram eficientes no controle 'in vitro' de *Aspergillus* sp., nas condições testadas.

Este estudo, embora preliminar, dá suporte para a condução de trabalhos sob diferentes condições, como casa de vegetação e à campo, visando a verificação do potencial antagônico desses isolados em outros ambientes e para outros organismos.

Referências bibliográficas

- BERG, G., ROSKOT, N., SMALLA, K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal Clinical Microbiology** 37: 3594-3600, 1999.
- BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e Perspectivas. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 341p. 2009.
- BILGRAMI, K. S., SINHA, K. K., SINHA, A. K. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extracts. **Indian Journal of Medical Research** 96: 171-175. 1992.
- BOWEN, D. J., ENSIGN, J. C. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photobacterium luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology** 64: 3029-3035. 1998.
- DHINGRA, O. D., COELHO NETTO, R. A. Micotoxinas em grãos. Revisão **Anual de Patologia de Plantas** 6: 49-101. 1998.
- FILHO, E. S. A. Comportamento de microbiota residente, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* inculadas em carne de atum (*Thunnus albacares*), estocada sob refrigeração (0°C ± 1°C) em diferentes atmosferas modificadas. 142f. **(Tese de Doutorado)**. Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2006.
- GLARE, T. R., O' Callaghan, M. *Bacillus thuringiensis*: **Biology, ecology and safety**. Chichester. John Wiley & Sons. 2000.
- JANISIEWICZ, W. J., Korsten, L. Biological control of postharvest disease of fruits. **Annual Review of Phytopathology** 40: 411-441. 2002.
- LUZ, W. C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira** 28: 37-40. 2003.
- MARTÍNEZ-BLANCH, J. F., SÁNCHEZ, G. AZNAR, R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International Journal of Food Microbiology** 135: 15-21. 2009.
- MELO, R. A. G., MARIANO, R. L. R., MICHEREFF, S. J., MENEZES, M., COELHO, R. S. B. Controle biológico da podridão-mole do pimentão (*Capsicum annum*) causado por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Summa Phytopathologica** 21: 206-212. 1995.
- MISHRA, D., DUBEY, N. K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 1101-1105. 1994.
- REIS, G. M. Variabilidade genética de cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. 113f. **(Dissertação de Mestrado)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SANHUEZA, R. M. V. Leveduras para o controle de fitopatógenos. In: 6 Simpósio de Controle Biológico, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fiocruz, p.340-343, 2000.
- SANTOS, A., FERREIRA, M. V. R., SOARES, A. E., SILVA, M. A., ALMEIDA, J. J., SHIOMI, H. F. Seleção de bactérias com ação antagonica a *Sclerotinia sclerotiorum* a partir de biofertilizantes. **Jaguariúna. Summa Phytopathologica**. Jaguariúna: Grupo paulista de fitopatologia, 2012. v.38, Supl. cd-rom. 2012.
- VANZOLINI, S., TORRES, R. M., PANIZZI, R. C. Efeito do tamanho, da densidade e do tratamento fungicida sobre a qualidade de sementes de amendoim. **Revista Ceres** 47: 603-612. 2000.
- YADAV, E., PATHAK, D. V., SHARMA, S. K., KUMAR, M., SHARMA, P. K. Isolation and

characterization of mutants of *Pseudomonas maltophilia* pm-4 altered in chitinolytic activity and antagonistic activity against root rot pathogens of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*). **Indian Journal of Microbiology** 47: 64-71. 2007.