

POTENCIAL ANTAGONÍSTICO DE *Bacillus subtilis* (BSV-05) CONTRA OS PATÓGENOS RADICULARES DO FEIJOEIRO: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*

Bruno Sérgio Vieira^{1*}, Hyann Markos Pereira Vieira², Luciana Alves Sousa³, Karoline Damasceno Ribeiro Mendonça⁴

¹Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fitopatologia. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, Rodovia LMG 746, Km 01, s/n, Bloco 1. Monte Carmelo-MG, Brasil. CEP: 38500-000.

²Engenheiro Agrônomo. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, Rodovia LMG 746, Km 01, s/n, Bloco 1. Monte Carmelo-MG, Brasil. CEP: 38500-000.

³Bióloga, Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, Rodovia LMG 746, Km 01, s/n, Bloco 1. Monte Carmelo-MG, Brasil. CEP: 38500-000.

⁴Engenheira-Agrônoma. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo, Rodovia LMG 746, Km 01, s/n, Bloco 1. Monte Carmelo-MG, Brasil. CEP: 38500-000.

*Autor para correspondência: Bruno Sérgio Vieira: brunovieira@ufu.br

RESUMO: Objetivou-se no presente trabalho avaliar o potencial antagonístico *in vitro* de um isolado de *Bacillus subtilis* – BSV-05 contra quatro patógenos radiculares do feijoeiro, a saber: *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. Foram utilizadas as seguintes metodologias *in vitro* versus os patógenos citados: cultivo pareado, inoculação conjunta, produção de metabólitos voláteis e não voláteis. Os percentuais de inibição do isolado BSV – 05 sobre *M. phaseolina*, *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum*, foram de 61,43%; 50,36%; 13,74% e 7,7%, respectivamente, para a metodologia do cultivo pareado. O contato direto da bactéria com os patógenos inibiu em 100% o crescimento micelial de *M. phaseolina*, *R. solani*; e para *F. solani* e *F. oxysporum*, foram observadas inibições de 90 e 92 %, respectivamente. Possíveis metabólitos secretados pelo isolado BSV 05 apresentaram níveis de inibição de 100% para *R. solani*. Para *M. phaseolina*, observou-se uma porcentagem de inibição de 80,26%; e 45,31% e 47,80% para *F. solani* e *F. oxysporum*, respectivamente. A porcentagem de inibição da germinação de conídios de *F. solani* e *F. oxysporum* e *M. phaseolina* num meio de cultura contendo substâncias metabolizadas por BSV – 05 foi de 87,70; 91,28% e 100%, respectivamente. O isolado bacteriano BSV-05 não produziu nenhum metabólito volátil.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico; Bactéria; Fungos fitopatogênicos; *Phaseolus vulgaris*.

ANTAGONISTIC POTENTIAL OF *Bacillus subtilis* (BSV- 05) AGAINST PATHOGENS ROOT OF BEAN: *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the antagonistic potential *in vitro* of this isolate *Bacillus subtilis* – BSV-05 against four root bean pathogens: *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. The following *in vitro* methodologies were used versus pathogens cited: paired cultivation, influence of joint inoculation (pathogen and antagonist), and production of volatile and non-volatile metabolites. The percentage inhibition of BSV – 05 on *M. phaseolina*, *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* were 61.43%; 50.36%; 13.74% and 7.7%, respectively, to the methodology of paired cultivation. Direct contact of the bacteria with pathogens inhibited by 100% garlo growth of *M. phaseolina*, *Rhizoctonia solani*; and for *F. solani* and *F. oxysporum* it was observed garlo growth inhibitions of 90 and 92%, respectively. Possible metabolites secreted by BSV 05 have levels of inhibition of 100% for *R. solani*. For *M. phaseolina*, there was an inhibition percentage of 80.26% and 45.31% and 47.80% for *F. solani* and *F. oxysporum*, respectively. The percentage of inhibition of spore germination of *F. solani* and *F. oxysporum* and *M. phaseolina* in a culture media containing substances metabolized by BSV – 05 was 87.70; 91.28% and 100%, respectively. The isolate the BSV-05 showed not produce no volatile metabolite.

KEYWORDS: Antagonist; Biological control; Bacteria; Pathogenic fungi.

INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em todo território nacional, constituindo-se numa das principais fontes de proteína para a alimentação humana (Carbonell e Pompeu, 2000; Conab, 2016). A ocorrência de doenças é um dos principais fatores relacionados com a baixa produtividade da cultura (Estefani et al., 2007).

No Brasil, doenças do sistema radicular do feijoeiro são relatadas em praticamente todas as regiões de cultivo, com intensidade variando em função do garlo presente na área, da suscetibilidade da cultivar, das condições climáticas e de práticas de manejo do solo, destacando-se aquelas causadas pelos fungos *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenv. f.sp. *phaseoli* (Burk.) Snyd. & Hans, *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. E *Rhizoctonia solani* Kuhn (Bianchini et al., 2005).

Patógenos radiculares do feijoeiro podem ser definidos como organismos que passam a maior parte de seu ciclo de vida no solo, infectam órgãos subterrâneos ou caules das plantas, têm capacidade de sobreviver no solo por um longo período na ausência de seus hospedeiros, possuem capacidade de competição saprofítica e seus estádios de disseminação e sobrevivência são confinados ao solo, embora alguns possam produzir esporos disseminados pelo ar ou água (Casaet al., 2011). Além disso, devido à infecção inicial e o desenvolvimento subsequente das doenças ocorrerem na maioria das vezes abaixo do nível do solo, patógenos radiculares são comparativamente inacessíveis à manipulação direta do homem, e as doenças frequentemente não são notadas até que atinjam estádios bem avançados e as opções de controle tornem-se limitadas (Wheeler e Rush, 2001b).

No atual estado de arte, o controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para a redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógenos radiculares. A diversidade de microrganismos, bem como suas relações antagonicas, surge como ferramenta importante para o controle biológico aplicado (Lanna et al., 2010).

Durante um trabalho de seleção de bactérias antagonistas realizado no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) da Universidade Federal de Uberlândia (Campus Monte Carmelo), um isolado provisoriamente identificado com o código BSV – 05 se destacou quanto ao potencial antagonístico contra

os fitopatógenos isolados do feijoeiro, a saber: *F. solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani*. O isolado bacteriano (BSV – 05) foi identificado por meio de testes bioquímicos como pertencente ao gênero *Bacillus*, o que encorajou ainda mais a uma investigação científica sobre seu uso como agente de biocontrole. A determinação da espécie foi feita por métodos moleculares, sendo o isolado BSV – 05 identificado como *Bacillus subtilis*.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial antagonístico do isolado bacteriano BSV – 05 contra os citados patógenos radiculares do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Influência do cultivo pareado do isolado bacteriano BSV-05 no crescimento de *F. solani* f. sp. *Phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani*.

Os isolados fúngicos fazem parte da coleção micológica do LAMIF (Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia) da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo.

Avaliou-se o efeito antagônico do isolado bacteriano (BSV-05) no crescimento dos patógenos radiculares em questão. Foi utilizada a técnica do cultivo pareado de culturas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose gar). Para isso, discos de micélio (0,5 cm de diâmetro) foram retirados de culturas puras de cada um dos quatro fitopatógenos previamente repicados a 2 cm de distância da borda de placas de Petri de 9 cm contendo meio de cultura BDA. Em seguida, no lado oposto das placas, também em uma distância de 2 cm da borda, o antagonista (isolado bacteriano (BSV-05) também proveniente de cultura pura, foi inoculado por estrias, as quais foram feitas com auxílio de uma alça de platina. Como testemunha, os fitopatógenos foram cultivados isoladamente em placas de Petri contendo o meio BDA, por meio da transferência de um disco de micélio também a 2 cm da borda das placas. As placas foram mantidas em câmara tipo BOD com fotoperíodo de 12/12 horas de luz/escuro e temperatura de 25° C.

A avaliação foi feita após sete dias de incubação, determinando-se o diâmetro do crescimento micelial dos patógenos, com o auxílio de uma régua milimetrada. Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a fórmula: % inibição = [(crtest –

$\text{crtrat} / \text{crtest}] \times 100$, onde: crtest = crescimento radial testemunha; crtrat = crescimento radial tratamento.

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 testemunhas, realizando cinco repetições de cada, onde cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. Análise estatística realizada foi o Teste SNK (Student-Newman-Keuls) para a comparação das médias, a 5% de significância, processadas pelo software de Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados Sisvar (Ferreira, 1999).

Influência da inoculação conjunta do isolado bacteriano BSV-05 no crescimento de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, *Foxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani*

Para avaliar o efeito fungicida ou fungistático sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos, 100 µL de cultura da bactéria e fragmentos de micélio de cada um dos quatro fungos cultivados em meio de cultura de BDA foram misturados por agitação em vórtex e posteriormente repicados em placas de Petri de 9 cm contendo o meio de cultura BDA semi-sólido. As placas foram incubadas por 15 dias a 25°C em câmara tipo BOD. As testemunhas foram compostas de placas contendo apenas garlo dos fungos no mesmo meio de cultura. A avaliação foi feita após 15 dias, medindo-se o diâmetro das culturas fúngicas repicadas conjuntamente com a bactéria, em comparação com a testemunha. Para o cálculo da inibição do crescimento micelial foi usada a **fórmula citada no experimento de cultivo pareado**.

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 testemunhas, realizando cinco repetições de cada, em que cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste Teste SNK (Student-Newman-Keuls) para a comparação das médias, a 5% de significância, processadas pelo software de Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados Sisvar (Ferreira, 1999).

Avaliação da produção de metabólitos pelo isolado bacteriano (BSV-05) e seus efeitos no crescimento de *F. solani*. *F.sp. phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani*

Metabólitos não voláteis

Para testar se o isolado bacteriano BSV-05 produz metabólitos não voláteis e se esses metabólitos

produzidos influenciam no crescimento micelial dos fitopatógenos, alíquotas de 200 mL de meio BD (Batata-Dextrose) foram acondicionadas em frascos Erlenmeyers e nestes foram transferidos discos de BDA contendo a bactéria (BSV – 05) proveniente de cultura pura. Os frascos foram incubados a 25° C, sem agitação, na ausência de luz, durante 15 dias. Após esse período foi adicionado aos Erlenmeyers 20g de gar/litro de BD e os mesmos foram submetidos ao processo de autoclavagem a 120° C durante 20 minutos (Amin et al., 2012). O meio de cultura autoclavado, contendo o (s) provável (is) metabólito (s) produzido (s) pela bactéria foram vertidos em placas de Petri de 9 cm, e, então, foram repicados, separadamente, discos de micélio (0,5 de diâmetro) de cada um dos quatro patógenos, para o centro das placas. As placas foram incubadas em câmara tipo BOD a 25°C por 15 dias. Como testemunha, os fitopatógenos foram cultivados em placas de Petri contendo apenas meio de cultura BDA, sem metabólitos. A avaliação do crescimento micelial foi feita por meio da medição do diâmetro do crescimento micelial de cada patógeno, em comparação com a testemunha.

Para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial, foi aplicada a fórmula citada no experimento de cultivo pareado. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 testemunhas, realizando cinco repetições de cada, em que cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental. As variáveis foram submetidas ao teste Teste SNK (Student-Newman-Keuls) para a comparação das médias, a 5% de significância, processadas pelo software de Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados Sisvar (Ferreira, 1999).

Metabólitos voláteis

Para avaliar se o isolado bacteriano BSV-05 produz metabólitos voláteis e verificar os efeitos desses metabólitos no crescimento dos fitopatógenos foi adotado o método de placas sobrepostas (Baker e Cook, 1973). Para tal, discos de micélio de cada um dos fitopatógenos foram repicados para o centro de placas de Petri de 9cm, contendo meio de cultura BDA. Paralelamente a bactéria foi inoculada por estrias, com o auxílio de uma alça de platina em placas contendo meio de cultura 523. As placas foram acondicionadas em câmara tipo BOD a 25°C por 24

horas. Após esse período, as placas foram abertas em condições assépticas e as placas contendo os fitopatógenos foram sobrepostas às do antagonista, e em seguida unidas e vedadas por filme de PVC para impedir o escape de metabólitos voláteis. Como testemunha, placas repicadas com os fitopatógenos foram sobrepostas a outras contendo apenas o meio de cultura BDA. As placas foram incubadas em câmara tipo BOD, a 25°C. Após dez dias de incubação em BOD, foi realizada a avaliação, medindo-se o diâmetro do crescimento micelial dos fitopatógenos, em comparação com a testemunha.

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 testemunhas, realizando cinco repetições de cada, onde cada placa de Petri constituiu uma unidade experimental.

Efeito do metabólito do isolado bacteriano BSV-05 sobre a germinação de conídios de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli* e *M. phaseolina*

A bactéria foi repicada para Erlenmeyers contendo o meio de cultura líquido BD (Batata dextrose) e, em seguida incubada em regime estacionário, no escuro, a 25°C durante 15 dias para produção do suposto metabólito. Em seguida, foi adicionado aos Erlenmeyers 20 g de gar/litro de meio de cultura e os mesmos foram autoclavados (120°C durante 20 minutos) para matar a bactéria. O meio de cultura contendo o provável metabólito foi então vertido em placas de Petri de 9 cm (Baker e Cook, 1973). A testemunha consistiu de placas contendo apenas o meio de cultura BDA. Em seguida, foram preparadas suspensões de conídios dos patógenos

em concentrações ajustadas para 2×10^4 conídios/mL. Alíquotas de 100 µl dessa suspensão foram pipetadas nas placas contendo o meio de cultura com o provável metabólito. As placas foram incubadas à 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas. Foram feitas duas avaliações (12 e 24 horas). Nas avaliações foram contados 100 conídios de cada patógeno, sendo considerados como conídios germinados somente aqueles que apresentaram comprimento do tubo germinativo correspondente a 50% ou mais do comprimento.

As variáveis foram submetidas ao teste Teste SNK (Student-Newman-Keuls) para a comparação das médias, a 5% de significância, processadas pelo software de Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados Sisvar (Ferreira, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência do cultivo pareado do isolado bacteriano BSV-05 no crescimento de *F. solani* f. sp. *Phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani*.

O isolado de *B. subtilis* BSV-05 inibiu em 61,43 e 50,36%, respectivamente, o crescimento micelial de *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani* em relação às suas testemunhas e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 1). Alguns trabalhos inferem que porcentagens de inibição do crescimento micelial de patógenos de 40% ou mais indicam um possível potencial como agente de controle biológico (Lanna et al., 2010). Menores valores de inibição do crescimento micelial foram observados para *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *F. solani* f.sp. *phaseoli*, 13,74 e 7,7%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PICM) de patógenos radiculares do feijoeiro em cultivo pareado com o isolado BSV-05 (A), em inoculação conjunta com o isolado BSV-05 (B), sob a ação de metabólitos não voláteis produzidos por BSV-05 (C) e porcentagem de inibição da germinação de conídios (PIGC) de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Macrophomina phaseolina* sob a ação de metabólitos não voláteis produzidos por BSV 05 (D).

PATÓGENO	PICM (%)	PICM(%)	PICM (%)	PIGC (%)
	(A)	(B)	(C)	(D)
<i>Macrophomina phaseolina</i>	61,43 a	100,00 a	80,26 a	100,00 a
<i>Rhizoctonia solani</i>	50,36 a	100,00 a	100,00 a	-----
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>p haseoli</i>	13,74 b	92,00 b	47,80 b	91,28 b
<i>F. solani</i> f. sp. <i>p haseoli</i>	7,70 b	90,00 b	45,31 b	87,70 b

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste SNK no nível de 5% de significância.

Resultados semelhantes ao que está sendo relatado no presente estudo foram descritos por outros grupos de estudo que empregaram metodologia similar para avaliar a atividade fungistática de *Bacillus* spp. e *B. subtilis* contra fungos causadores de doenças em plantas (Kupper et al., 2003; Angonese et al., 2009; Saharan, 2011; Singh et al., 2012; Konusny-Andreani et al., 2014; Vafadar et al., 2014).

A bactéria endofítica *B. subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium moniliforme* (Bacon et al., 2001). Isolados de *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos (*Citrus* spp.), tanto sob condições de laboratório como nas condições de campo (Kupper et al., 2003). Bactérias do gênero *Bacillus* mostraram-se eficientes antagonistas *in vitro* contra *M. phaseolina*, agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L.) (Marroni e Germani, 2011). Em batata-doce (*Ipomea batatas*) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), a aplicação de *B. subtilis* reduziu a incidência de *R. solani*, *Pythium* sp. E outros patógenos, além de estimular a germinação, o crescimento e a produtividade das plantas (Baldotto et al., 2010). Em conjunto, esses estudos demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos e possuem várias vantagens para exploração comercial na agricultura. *Bacillus* spp. são facilmente cultivadas em meios de cultura líquidos de baixo custo, o que facilita a produção massal em fermentadores industriais. Produz endósporos de resistência, o que aumenta a vida de prateleira dos produtos e a utilização integrada com produtos químicos (Lanna et al., 2010).

Influência da inoculação conjunta do isolado bacteriano BSV-05 no crescimento de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani*

O contato direto da bactéria com os fitopatógenos, *M. phaseolina* e *R. solani*, apresentou inibição de 100% do crescimento micelial em relação as suas respectivas testemunhas (Tabela 1). Os resultados observados corroboram aqueles obtidos no cultivo pareado para os fitopatógenos *M. phaseolina* e *R. solani*.

Em relação a *F. solani* f. sp. *Phaseoli* e *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, observou-se também uma elevada diminuição do crescimento micelial destes dois patógenos, observando-se inibições de 90 e 92 %, respectivamente (Tabela 1).

Estes resultados divergem daqueles obtidos com a técnica de cultivo, na qual foram observados baixos valores de inibição micelial para ambos patógenos. Podemos constatar com isso, que para se avaliar e selecionar potenciais antagonistas deve-se testar diferentes metodologias (Lanna et al., 2010).

Figueiredo et al. (2010) testaram o isolado CNPMS-22 contra seis fungos fitopatogênicos (*Fusarium moniliforme*, *Exserohilum turcicum*, *Acremonium strictum* e *Colletotrichum sublineolum*), causadores de doenças nas culturas do milho e do sorgo quanto a presença de atividade antagonista. Neste trabalho, o isolado de *B. subtilis* CNPMS-22 impediu o crescimento de todas as seis espécies de fungos fitopatogênicos testados e não foram observadas variações significativas nos resultados entre os três experimentos (inoculação de fragmentos de cultura fúngica em cultura estabelecida da bactéria CNPMS-22; inoculação da bactéria após o estabelecimento da cultura do fungo em uma das metades de placa contendo LB ou BDA e inoculação conjunta bactéria CNPMS-22 + fungo).

Podemos inferir que para realmente confirmar o potencial antagonista de um microrganismo é imprescindível que se faça diversos testes tanto *in vitro* quanto em condições de campo, pois podemos observar diferenças de inibições entre patossistemas e metodologias (Yan et al.; 2011; Dev Sharma et al., 2013).

Avaliação da produção de metabólitos pelo isolado bacteriano BSV-05 e seus efeitos no crescimento de *F. solani* f. sp. *Phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, *M. phaseolina* e *R. solani* **Metabólitos não voláteis**

Podemos observar que possíveis metabólitos secretados por *B. subtilis*- BSV 05 apresentaram um grande potencial para o controle de *R. solani*, sendo observados níveis de inibição do crescimento micelial de 100,00% para este patógeno (Tabela 1). Para *M. phaseolina*, observou-se uma porcentagem de inibição de 80,26%, quando o micélio do fungo permaneceu

em contato com o meio de cultura contendo prováveis substâncias metabolizadas pela bactéria. Já para *F. solani* f.sp. *phaseoli* e *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, verificou-se menores porcentagens de inibição em relação aos outros patógenos testados, porém com valores ainda elevados, 45,31% e 47,80%, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente trabalho são bastante significativos, podendo inferir que o isolado de *B. subtilis* (BSV-05) apresentou um elevado potencial antagonístico contra os fitopatógenos testados. Bactérias antagonistas da espécie *Bacillus subtilis*, sabidamente, agem por antibiose e tem amplo espectro de ação; sendo que a inibição dos fungos a partir da produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (Kupper et al., 2003).

Isolados de *B. subtilis* produzem uma grande variedade de metabólitos antifúngicos, entre os quais se encontram lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina. Estes peptídeos são compostos cíclicos de sete ou dez α -aminoácidos ligados a um único β -amino (iturinas) ou β -hidroxi (surfactinas e fengicinas) ácido graxo. O comprimento desta cadeia de ácidos graxos pode variar de C13 a C16 para surfactinas, de C14 a C17 para iturinas e de C14 a C18, no caso de fengicinas (Ongena et al., 2005). Embora estruturalmente semelhantes, surfactinas, iturinas e fengicinas diferem em alguns aspectos biológicos em relação à sua atividade. Como exemplo, iturinas e fengicinas exibem uma forte atividade antifúngica e são inibitórios para o crescimento de uma ampla gama de fitopatógenos. No tocante a surfactinas, as mesmas não são por si fungitóxicas, mas exercem algum efeito sinérgico antifúngico, quando em companhia da iturina A (Lanna et al., 2010).

Outros autores já demonstraram por meio de metodologias semelhantes ao presente trabalho à ação de metabólitos produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* contra fungos fitopatogênicos. Remuska et al. (2007), demonstraram que isolados de *B. thuringiensis* foram eficientes em produzir metabólitos que inibiram o crescimento de importantes patógenos, como *Sclerotium rolfsii* e *R. solani*. Marroni e Germani (2011) verificaram que a cepa RZ 2 de *Bacillus* sp. Conseguiu inibir o crescimento de *M. phaseolina*, patógeno da mamona em 24%, por meio de seus metabólitos não voláteis.

Metabólitos voláteis

O isolado bacteriano BSV-05 (*B. subtilis*) não apresentou nenhum provável metabólito volátil capaz de inibir ou diminuir o crescimento de nenhum dos quatro patógenos testados neste trabalho.

Dados recentes revelam que *B. subtilis* é capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica. No entanto, muitas dessas substâncias voláteis produzidas por este microrganismo são ainda desconhecidas (Kai et al. 2007). Chen et al. (2008) encontraram 14 compostos voláteis de *B. subtilis*, identificados através da cromatografia gasosa de espectro de massa (CG-MS), com aparente fonte de compostos bioativos. A natureza antifúngica de alguns dos compostos, tais como 2-etil-hexanol, 2,4-bis (2-metilpropil) fenol, 4-hidroxibenzaldeído e 2-nonanona, foi também demonstrada em outros patossistemas (Almenar et al., 2007).

No presente trabalho podemos verificar que tais substâncias não foram produzidas pelo isolado BSV-05; o que evidencia ser antibiose o mecanismo envolvido na supressão dos patógenos radiculares do feijoeiro testados.

Efeito do metabólito do isolado bacteriano BSV-05 sobre a germinação de conídios de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *Phaseoli* e *M. phaseolina*

A porcentagem de inibição da germinação de conídios de *F. solani* f.sp. *phaseoli* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *M. phaseolina* num meio de cultura contendo substâncias metabolizadas pelo isolado BSV – 05 foi de 87,70; 91,28% e 100,00%, respectivamente (Tabela 1).

É sabido que bactérias do gênero *Bacillus* produzem diversas enzimas como quitinases, que são antagônicas a diversos fitopatógenos, tais como *F. sambucinum* (Sadfi et al., 2001), *Helminthosporium solani* Dur. & Mont. (Martinez et al., 2002) e *Sclerotium rolfsii* Sacc., *F. oxysporum* Schl., e *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp (Di Fiore Del Gallo, 1995) e que podem estar relacionadas à capacidade de inibir a germinação de esporos fúngicos (Shiomi et al., 2006). Estes últimos autores observaram em seu trabalho que vários isolados de bactérias endofíticas demonstraram eficácia na inibição da germinação de urediniosporos de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br, agente

causal da ferrugem do cafeeiro, com valores acima de 50,00% de inibição.

No presente trabalho foram observadas inibições na germinação de conídios de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *M. phaseolina* acima de 80,00% na presença de substâncias produzidas pelo isolado BSV-05, o que na prática pode resultar numa diminuição expressiva das infecções causadas pelos referidos patógenos no campo.

Ao se observar os resultados obtidos *in vitro*, pode-se inferir que o isolado de *B. subtilis* (BSV-05) tem um forte poder de inibição sobre os patógenos radiculares do feijoeiro testados. O metabólito não volátil produzido pela bactéria está sendo identificado por cromatografia líquida.

Como os resultados são promissores, trabalhos em casa de vegetação estão sendo feitos para corroborar o potencial antagonístico de *B. subtilis* (isolado BSV-05) contra os patógenos radiculares do feijoeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almenar, E.; Valle, V.D.; Catalla, R.; Gavara, R. Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55, 2240-2245.
- Amin, A.; Khan, M.A.; Ehsanullah, M.; Haroon, U.; Azam, S.M.F.; Hameed, A. Production of peptide antibiotics by *Bacillus* sp: GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Brazilian Journal Microbiology*. **2012**, 43, 1340-1346.
- Angonese, M.T.; Della-Giustina, J.; Paim, L. H.; Pansera, M. R.; Pagno, R. S.; Mezzomo, F., Zorzi, E.; Pereira, C.O. F.; Ribeiro, R.T.S. Fungistatic effect of *Bacillus* spp. on plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Agroecologia*. **2009**, 4, 97-100.
- Bacon, C. W.; Yates, I. E.; Hinton, D. M.; Meredith, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*. **2001**, 109, 325-332.
- Baker, K. F.; Cook, R. J. Biological control of plant pathogens. San Francisco: W. H. Freeman, **1974**. 433p.
- Baldotto, L. E. B.; Baldotto, M. A.; Olivares, F. L.; Viana, A. P.; Bressan-smith, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. **2010**, 34, 349-360.
- Bianchini, A.; Maringoni, A.C.; Carneiro, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A. M., Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo-SP, **2005**, V.2, 663p.
- Carbonell, S. A. M; Pompeu, A. S. Estabilidade fenotípica de linhagens de feijoeiro em três épocas de plantio no estado de São Paulo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **2000**, 35, 2, 321-329.
- Casa, R. T.; Krieger, I.; Kuhnem Junior, P. R.; Bogo, A.; Moreira, E. N.; PontelRizzi, F. P. Podridão radicular em feijão no sistema plantio direto. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. **2011**, 10, 1, 37-43.
- Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 04 de abril de 2016.
- Chen, H.; Xiao, X.; Wang, J.; Wu, L.; Zheng, Z.; Yu, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters*. **2008**, 30, 919-923.
- Dev Sharma, S.C.; Shovon, M. S.; Jahan, M. G. S; Asaduzzaman, A.K.M.; Rahaman, M.A.; Biswas, K.K.; Abe, N. R. Antibacterial and cytotoxic activity of *Bacillus methylotrophicus*-scs 2012 isolated from soil. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*. **2013**, 2, 2293-2307.
- Di fiore, S.; Del Gallo, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: Fendrik, I., Del gallo, M., Vanderleyden, J., De Zamaroczy, M. (Ed.) *Azospirillum* VI and related microorganisms. Springer-Verlag, Berlin. **1995**, 169-187.
- Estefani, R. C. C., Miranda Filho, R.J.; Uesugi, C.H. Tratamentos térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium*

- flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e efeitos na qualidade fisiológica das sementes. *Fitopatologia Brasileira*, **2007**, 32, 5, 434-438.
- Ferreira, D. F. Sisvar. Sistema para análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, **1999**. 92 p.
- Figueiredo, J.E. F.; Gomes, E.A.;Guimarães, C. T.; Lana, U.G. P.; Teixeira, M. A.; Lima, G.V. C.; Bressan, W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*. **2009**, 40, 522-534.
- Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G.; Piechulla, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*. **2007**, 187, 351-360.
- Konusny-Andreani, D.I.; Agiado, J.C.; Andreani Junior, R. Efeito de bactérias rizosféricas sobre o desenvolvimento da cenoura. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. **2014**, 12, 211-220.
- Kupper, K. C.; Gimenes-Fernandes, N.; Goes, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*. **2003**, 28, 251-257.
- Lanna, F. R.; Ferro, H. M.; Pinho, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*. **2010**, 4, 12-20.
- Marroni, I. V.; Germani, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*. **2011**, 6, 111-115.
- Martinez, C.; Michaud, M.; Belanger, R. R.; Tweddell, R.J. Identification of soils suppressive against *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Soil Biology and Biochemistry*. **2002**, 34, 1861-1868.
- Ongena, M.; Duby, F.; Jourdan, E.; Beaudry, T.; Jadin, V.; Dommes, J.; Thonart, P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2005**, 67, 692-698.
- Remuska, A.C.; Pria, M.;Dalla. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. *Ciência Agrícola*. **2007**, 13, 31-36.
- Sadfi, N.; Cherif, M.; Fliss, I.; Boudabbous, A.; Antoun, H. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*. **2001**, 83, 101-118.
- Saharan, B. S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*. **2011**.30p.
- Shiomi, H. F.; Silva, H. S.; Melo, I. S; Nunes, F. V.; Bettiol, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Sciencia Agrícola*, **2006**, 63, 32-39.
- Singh, J.S.; Pandey, V.C.; Singh, D.P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture an environmental development. *Agriculture. Ecosystems Environment*, **2001**, 140, 3-4, 339-353.
- Vafadar, F.; Amooaghaie, R.; Otrousha, M. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Plant Interactions*, **2014**, 9, 128-136.
- Wheeler, T.; Rush, C.M. Soilborne diseases. In: Maloy, O. C.; Murray, T.D. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Pathology*. John Wiley& Sons,New York. 2001b, 935-947.
- Yan, X.; He, L.; Song, G.; Wang, R. Antagonistic bioactivity of endophytic strains isolated from *Salvia miltiorrhiza*. *African Journal Biotechnology*, **2011**, 10, 15117-15122.