

## NOTAS CIENTÍFICAS

### Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos<sup>(1)</sup>

Carlos Brasil Batista Junior<sup>(2)</sup>, Ulisses Brigatto Albino<sup>(2)</sup>, Alexandre Martin Martins<sup>(3)</sup>, Dennis Panayotes Saridakis<sup>(3)</sup>, Leopoldo Sussumu Matsumoto<sup>(3)</sup>, Marco Antonio Avanzi<sup>(3)</sup> e Galdino Andrade<sup>(3)</sup>

Resumo – Quatro isolados bacterianos da rizosfera de *Drosera villosa* var. *villosa* (B1, B2, B3, B4) e dois isolados de *Bacillus thuringiensis* (B5 e B6), sendo B6 produtor da toxina bioinseticida Cry1Ab, foram avaliados quanto à capacidade de inibir os fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* sp. A cepa mais efetiva foi B1 que inibiu o crescimento dos quatro fungos até o 26º dia. *B. thuringiensis* inibiu o crescimento de três destes, o que indica que possui atividade antifúngica e abre um novo campo de estudo para a utilização do *B. thuringiensis*.

Termos para indexação: bactéria, rizosfera, controle biológico.

#### Fungistatic effect of *Bacillus thuringiensis* and of other bacteria on some plant pathogenic fungi

Abstract – Four bacteria isolates from the rhizosphere of *Drosera villosa* var. *villosa* (B1, B2, B3, B4) and two *Bacillus thuringiensis* isolates (B5 e B6), being B6 a bioinsecticidal Cry1Ab protein producer, were tested for their capacity to inhibit phytopathogenic fungi such as *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* sp. The B1 isolate was highly effective and inhibited all fungi up to the 26<sup>th</sup> day. *B. thuringiensis* inhibited the growth of three fungi, and this result opens a new area to study and test *B. thuringiensis*.

Index terms: bacteria, rhizosphere, biological control.

A ausência de especificidade e os riscos para a saúde humana e para o ambiente apresentados pelos defensivos agrícolas sintéticos acentuam a necessidade de ferramentas como o controle biológico na otimização dos sistemas de agricultura sustentável.

---

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 19 novembro de 2001.

<sup>(2)</sup> Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas, Dep. de Microbiologia, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990 Londrina, PR. Bolsista do CNPq. E-mail: carlosbrasiljr@aol.com.br, ualbino@uel.br

<sup>(3)</sup> UEL. E-mail: martinmartines@onda.com.br, denisdiaboloiro@bol.br, leopoldo@ffalm.br, mavanzi@bol.com.br, andradeg@uel.br

Bactérias do solo, especificamente bactérias rizosféricas, podem ser eficientes no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (Oedjijono & Dragar, 1993; Andrade et al., 1998). Na avaliação dos grupos funcionais de microrganismos da rizosfera de *Drosera villosa* var. *villosa* A. St.-Hil, foram encontradas bactérias que inibiam o crescimento de fungos saprófitos em placa de Petri em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Esta planta ocorre em ambientes pobres em nutrientes, exigindo alto grau de especialização; isto sugere que estas bactérias possuem um complexo mecanismo de sobrevivência, produzem compostos que inibem o crescimento de outros microrganismos, e constituem biocontroladores de elevado potencial.

Bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos (Petras & Casida, 1985). O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria aeróbia facultativa, gram-positiva e produtora de endósporos. Durante o processo de esporulação, ocorre a produção de uma inclusão cristalina, composta por um ou mais polipeptídios, denominados  $\delta$ -endotoxinas, que são codificadas pelos genes Cry. Estes cristais são tóxicos a larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e ainda nematóides e ácaros (Dean, 1984).

O Bt responde por 90% dos produtos de controle biológico comercializados mundialmente, e é utilizado há trinta anos como agente de controle biológico de pragas (Valadares-Ingliš et al., 1998). Apesar de esta bactéria ser exaustivamente estudada, não há relatos na literatura sobre sua capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos. Seria interessante que um agente de controle biológico como o Bt, ao ser empregado para o controle da lagarta, por exemplo, chegando ao solo, pudesse ter também ação contra fungos fitopatogênicos. Abrir-se-ia, então, uma nova oportunidade de controle de doenças em diversas culturas. Também, é necessário avaliar cuidadosamente o efeito que o Bt possa ter sobre fungos filamentosos saprófitos ou simbióticos como, por exemplos, os micorrízicos, o que poderia causar grande impacto na ciclagem de nutrientes no solo, e, conseqüentemente, na nutrição da planta.

A efetividade do cristal protéico bioinseticida levou a indústria de biotecnologia a introduzir os genes produtores em plantas. As plantas transgênicas Bt vêm sendo produzidas desde a década de 80, contendo genes Cry, visando somente ao controle de insetos. Estas plantas podem liberar a toxina através dos exsudatos da raiz, do pólen e de partes vegetativas, quando se decompõem. Alguns autores demonstraram que o cristal protéico rapidamente se liga a minerais de argila do solo, fica protegido da degradação microbiana (Tapp & Stotzky, 1995) e pode permanecer ativo no solo por até 234 dias (Saxena et al., 1999).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade fungistática do Bt e de bactérias isoladas da rizosfera de *D. villosa* var. *villosa*, visando buscar antagonistas para alguns fungos fitopatogênicos.

Os experimentos foram realizados durante o período de maio a agosto de 2000, no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, PR.

Os quatro isolados, denominados neste trabalho de B1, B2, B3 e B4, foram obtidos da rizosfera de *D. villosa* var. *villosa*, coletada em solos hidromórficos de campos gerais nos Municípios de Itararé, SP, 24°5'0" S e 49°11'57" W (GPS) e Jaguariaíva, PR, 24°23'23" S e 49°51'21" W.

De acordo com as características morfológicas, as cepas B1 e B3 são bastonetes gram-positivos; B2, bastonetes gram-negativos e B4, cocos gram-positivos. Após o teste de gram, os isolados foram congelados em N líquido e conservados em freezer a -70°C, suspensos em solução crioprotetora de glicerina estéril a 20%. Também foram utilizados dois isolados de *B. thuringiensis* (B5 e B6), ou seja: um, o 407 (Cry-), mutante não produtor do cristal protéico, e o outro, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 (Cry+), produtor do cristal com atividade inseticida, respectivamente.

Os fungos estudados foram *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, isolado de feijoeiro com sinais da doença; *F. solani* f. sp. *glycines*, isolado de plantas de soja e *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp., ambos isolados de algodoeiro, que apresentava sintomas das doenças.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 6, quatro fungos x seis bactérias e seus respectivos controles, com cinco repetições. O crescimento micelial foi avaliado aos 7, 18 e 26 dias de incubação. Cada um dos isolados fúngicos foi transferido com estilete para placas de Petri, com meio de cultura BDA em um único ponto, no centro delas. Em seguida, cada um dos isolados bacterianos foi inoculado por estria com alça de platina, a uma distância de 1,5 cm do ponto onde o fungo foi inoculado previamente, com exceção das placas-controle sem bactéria. As placas foram mantidas à temperatura média de 25°C, recebendo luz natural indireta. Nas avaliações, foi medido o diâmetro da colônia do fungo (cm), tomando-se o cuidado de medir o maior diâmetro.

Os períodos de incubação e os isolados bacterianos tiveram efeitos diferentes em relação ao crescimento micelial dos quatro fungos (Tabela 1). Todos os isolados apresentaram, em algum momento, efeito inibitório sobre o crescimento dos fungos. Na primeira avaliação, aos sete dias, somente as cepas B2 e B4 não apresentaram efeito inibitório contra *F. solani* f. sp. *phaseoli*; aos 18 dias, apenas os isolados B1 e B6 mantiveram o efeito inibitório, e permaneceram até o final do experimento. O fungo *F. solani* f. sp. *glycines* foi o que apresentou menor sensibilidade às bactérias, e foi inibido somente pelas cepas B1 e B6 desde a primeira avaliação. No entanto, B5 demonstrou efeito inibitório no fim do experimento, o mesmo acontecendo com o isolado *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 (Cry+), produtor do cristal bioinseticida. Este efeito inibitório pode estar relacionado com a produção de quitinases e de outras enzimas que podem ter ação contra a parede celular fúngica, já que algumas bactérias antagonistas de fungos fitopatogênicos podem produzir quitinases (Mavingui & Heulin, 1994). Também foi observado que o Bt possui atividade quitinolítica (Barbosa-Corona et al., 1999; Rojas-Avelizapa et al., 1999), porém, estes autores estavam buscando fatores de patogenicidade contra insetos, e não, contra fungos fitopatogênicos.

O Bt, que já é amplamente utilizado no controle biológico de insetos, poderá ter sua importância agrônômica aumentada, já que há indícios bastante

fortes de que esta bactéria possua atividade antifúngica. Este potencial pode ser explorado utilizando-se a bactéria ou mesmo as plantas transgênicas Bt também no controle de fungos fitopatogênicos.

Somente o isolado B2 não demonstrou efeito inibitório ao *F. oxysporum*, mas, a partir do décimo oitavo dia, o único efeito fungistático observado sobre este fungo foi do isolado B1.

O *Colletotrichum* sp., aos sete dias, não foi inibido por B3; e na avaliação seguinte, B2 não apresentou mais efeito inibitório. Aos 26 dias, o efeito inibitório foi mantido pelos isolados B1 e pelos dois *B. thuringiensis* testados. Apesar de o *Colletotrichum* sp. ter apresentado diminuição do diâmetro do micélio quando inoculado com o isolado B5, esta diferença não foi significativa quando comparada com o tamanho do micélio do décimo oitavo dia.

Os isolados B1 e B6 foram os que mostraram maior eficiência contra os fungos testados, e mantiveram efeito inibitório durante os 26 dias de duração do experimento.

Na caracterização morfológica, o isolado B1 mostrou ser uma bactéria do gênero *Bacillus*. Inúmeras espécies deste gênero já demonstraram atividade antifúngica (Kim et al., 1997; Podile & Laxmi, 1998), porém não foi relatado, até o momento, que estes isolados sejam eficientes contra diferentes espécies de

**Tabela 1.** Efeito fungistático das bactérias sobre o crescimento micelial (diâmetro da colônia em cm) de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (fungo 1), *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (fungo 2), *Fusarium oxysporum* (fungo 3) e *Colletotrichum* sp. (fungo 4), em três períodos de incubação<sup>(1)</sup>.

Bactéria <sup>(2)</sup>	Fungo 1	Fungo 2	Fungo 3	Fungo 4
Incubação por 7 dias				
Controle	8,50a	2,12ab	7,50b	4,16a
B1	4,52c	1,28c	3,50c	1,48c
B2	8,26a	2,28a	8,50a	2,16b
B3	5,92b	1,56bc	3,58c	3,82a
B4	7,90a	2,14ab	3,94c	1,72bc
B5	4,94c	1,68abc	3,68c	1,86bc
B6	4,58c	1,08c	3,90c	1,76bc
Incubação por 18 dias				
Controle	8,50a	6,53abc	8,50a	8,50a
B1	4,70b	2,86d	4,62b	4,04c
B2	8,50a	6,74ab	8,50a	8,50a
B3	8,50a	5,96c	8,50a	8,50a
B4	8,50a	6,32bc	8,50a	6,40b
B5	8,50a	7,12a	8,50a	6,50b
B6	5,02b	1,84e	8,50a	3,58c
Incubação por 26 dias				
Controle	8,50a	8,50a	8,50a	8,50a
B1	4,52b	3,20c	4,78b	5,52b
B2	8,50a	8,50a	8,50a	8,50a
B3	8,50a	8,50a	8,50a	8,50a
B4	8,50a	8,50a	8,50a	7,97a
B5	8,50a	5,04b	8,50a	6,12b
B6	4,82b	1,42d	8,50a	3,92c

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>B1, B2, B3 e B4: cepas não-identificadas, isoladas da rizosfera de *Drosera villosa* var. *villosa*; B5: *Bacillus thuringiensis* Cry-; B6: *B. thuringiensis* Cry+.

fungos fitopatogênicos, como B1 e B6 testados no presente trabalho.

O Bt demonstrou ser bastante eficiente contra os isolados de fungos. Quando comparados os resultados dos dois isolados Bt, o *B. thuringiensis* 407 (Cry-), mutante não-produtor de cristal, mostrou claramente baixo efeito inibitório para todos os isolados fúngicos. A presença do cristal bioinseticida parece ser importante, pois incrementa a eficiência do isolado B6 contra os fitopatógenos. No entanto, a ausência dos genes produtores do cristal protéico não interferiu no poder de degradação do micélio pelos isolados de Bt estudados.

Importante, no entanto, é conhecer o impacto que estas bactérias possam ter contra os grupos de microrganismos funcionais do solo, o que deve ser avaliado em qualquer organismo liberado no ambiente.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de Bolsas de Mestrado e Doutorado vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Dep. de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL); à Dra. Olivia M. N. Arantes, do Dep. de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, pela cessão das cepas de *B. thuringiensis*; ao Dr. José Roberto Menezes, que cedeu o fungo *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*; à Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, pela doação do fungo *F. solani* f. sp. *glycines*; ao Laboratório de Fitopatologia do Dep. de Agronomia da UEL, pelos isolados de *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp.

### Referências

- ANDRADE, G.; DE LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 311-316, 1998.
- BARBOSA-CORONA, J. E.; CONTRERAS, J. C.; VELAZQUEZ-ROBLEDO, R.; BAUTISTA-JUSTO, M.; GOMEZ, R. M.; CRUZ-CAMARILLO, R.; IBARRA, J. E. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**, London, v. 21, p. 1125-1129, 1999.
- DEAN, D. H. Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v. 2, p. 341-363, 1984.
- KIM, D.; COOK, R. J.; WELLER, D. M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 87, p. 551-558, 1997.
- MAVINGUI, P.; HEULIN, T. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 801-803, 1994.
- OEDJIJONO, M. A. L.; DRAGAR, C. Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 247-250, 1993.

PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. J. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1496-1501, 1985.

PODILE, A. R.; LAXMI, V. D. V. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenilalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, p. 255-259, 1998.

ROJAS-AVELIZAPA, L. I.; CRUZ-CAMARILLO, R.; GUERRERO, M. I.; RODRIGUES-VAZQUES, R.; IBARRA, J. E. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 15, p. 261-268, 1999.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. **Nature**, London, v. 402, p. 480, 1999.

TAPP, H.; STOTZKY, G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1786-1790, 1995.

VALADARES-INGLIS, M. C.; SOUZA, M. T. de; SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 208-217.