

INIBIÇÃO "IN VITRO" DA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE FUSARIUM EQUISSETI POR BACILLUS SUBTILIS

Débora Maria Massa Lima

Departamento de Micologia
da Universidade Federal de Pernambuco.
Av. Prof. Artur de Sá s/n. Cidade Universitária,
CEP 50739, Recife- Pernambuco- Brasil.

Claudia A. Menezes Escobar

Departamento de Antibióticos
da Universidade Federal de Pernambuco.

Palabras clave: *Fusarium equiseti*, *Bacillus subtilis*, inhibición.

Key words: *Fusarium equiseti*, *Bacillus subtilis*, inhibition.

RESUMO

Testes realizados "in vitro" utilizando uma cepa de *Bacillus subtilis* isolada como contaminante de cultura de *Fusarium sp.*, demonstrou efeito inibitório sobre a germinação e crescimento de *Fusarium equiseti*, agente causal de murcha em tomateiro. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em mm, após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, variando entre 27 - 30° C.

RESUMEN

[Inhibición "in vitro" de la germinación y crecimiento de *Fusarium equiseti* por *Bacillus subtilis*.]

Tests realizados "in vitro" utilizando una cepa de *Bacillus subtilis*, aislada como contaminante de un cultivo de *Fusarium sp.*, demostró efecto inhibitorio

sobre la germinación y el crecimiento de *Fusarium equiseti*, agente de marchitamiento del tomate. Los diámetros de las zonas de inhibición fueron medidos en mm. 24 horas después de incubación a temperatura ambiente, variando entre 27-30° C.

SUMMARY

[*In vitro* inhibition of germination and growth of *Fusarium equiseti* by *Bacillus subtilis*.]

Bacillus subtilis isolated as contaminant from culture of *Fusarium sp.*, showed an inhibitory effect "in vitro" over the germination and growth of *Fusarium equiseti*, agent of wilt of tomatoes. The diameter of inhibitory zone was measured in mm, after 24 hours incubation at temperature of 27 to 30° C.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a busca de agentes biológicos que permitam o efetivo controle de enfermidades causadas sobretudo por fungos, tem sido intensificada. O fenômeno de antagonismo

entre microrganismos ocorre naturalmente no solo, ao redor ou sobre a superfície de troncos, raízes e folhas de plantas (Odigie & Tkotum, 1982). Tem sido observado também, em culturas de patógenos contaminadas naturalmente ou em estudos realizados "in vitro", utilizando-se misturas de patógenos e saprófitas (Abo-El-Dahab & El-Goorani, 1964;

Bastos & Figuerêdo, 1976; Odigie & Ikotum, 1982). Espécies de *Bacillus*, incluindo *Bacillus subtilis*, isolado de diferentes substratos, vem demonstrando ser eficiente no controle de fungos fitopatogênicos, merecendo destaque aqueles responsáveis por murchas e podridões (Vasudeva, 1952; Dunleavy, 1955; Aldrich & Baker, 1970; Narendra & Singh, 1981; Podile & Dube, 1985). Entre esses agentes causais, *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. tem sido citado como agente causal de murchas e podridões em vários hospedeiros (Gordon, 1959, 1960; Booth, 1971; Lima, 1988) e como componente da microbiota de sementes (Nobel et al., 1958).

O objetivo do presente trabalho, foi verificar o efeito inibitório "in vitro", de uma cepa de bactéria identificada, de acordo com Claus & Berkeley (1986), como *Bacillus subtilis* Cohn, sobre a germinação e crescimento de *F. equiseti*.

MATERIAL E METODOS

F. equiseti foi isolado de "seedlings" de tomateiro, apresentando sintomas de murcha e mantido em tubos de ensaio contendo o meio de batata-dextrose-agar (PDA).

A cepa de *B. subtilis* foi isolada como contaminante de uma cultura de *Fusarium* sp., desenvolvida em meio de PDA contido em placa de Petri, onde demonstrou grande capacidade antagonística (inibição).

A avaliação do poder inibitório do *B. subtilis* sobre o crescimento de *F. equiseti*, foi feita utilizando-se placas de Petri contendo meio de PDA fundido à temperatura em torno de 40° C, ao qual foi adicionada suspensão do patógeno na proporção de 10%. Após solidificação do meio, discos de cultura de *B. subtilis* com 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento em meio de PDA, foram colocados no centro de cada placa. As placas inoculadas foram incubadas à temperatura ambiente variando entre 27-30° C. Para cada teste, foram feitas três repetições. Os diâmetros das zonas de inibição mostrando as redondas colônias de bactérias foram medidas em mm, após 24 horas da incubação e as médias das repetições registradas.

Para os testes de germinação de conídios de *F. equiseti* em presença de *B. subtilis*, foram utilizadas suspensões de esporos desses dois microrganismos em Tween 80 a 0,02% na concentração de 10⁶ conídios/ml de *F. equiseti* e de 32 x 10⁶ esporos/ml de *B. subtilis*. A contagem do número de esporos das suspensões foi feita em câmara de Neubauer.

Para esses testes, foram empregados dois procedimentos: a) semeou-se simultaneamente, 0,2 ml de cada uma das suspensões, sobre a superfície do meio de batata-dextrose-agar contido em placas de Petri; b) semeou-se, inicialmente, 0,2 ml de suspensão de *B. subtilis* e, após 24 horas de incubação à temperatura ambiente (+ 28° C), semeou-se 0,2 ml da suspensão de *F. equiseti*. As placas foram incubadas à temperatura ambiente e para cada teste, foram feitas três repetições. Como testemunha foi utilizada apenas a suspensão de *F. equiseti*.

O acompanhamento da germinação dos conídios foi feito através de observações a intervalos de 1 hora, durante 9 horas. O percentual de germinação foi obtido pela contagem de 500 esporos por placa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Acentuada atividade inibitória de *B. subtilis* sobre o crescimento de *F. equiseti* foi verificada através do aumento gradual das zonas de inibição, quando se utilizou culturas do antagonista com mais de 24 horas de crescimento (Tabela 1). O aumento do efeito inibitório decorreu provavelmente, de uma maior concentração de substâncias liberadas pelo antagonista no meio de cultura que, ao que tudo indica, foram produzidas a partir das 24 horas de crescimento, até atingir o período de 72 horas. Após este período, as zonas de inibição permaneceram estáveis, com um diâmetro de 60 mm (Figura 1).

Os resultados da germinação dos conídios, demonstraram a ausência de emissão de tubos germinativos, quando o *B. subtilis* foi semeado com 24 horas de antecedência ao plantio de *F. equiseti*. No caso em que os dois microrganismos foram semeados simultaneamente, houve 100% de germinação dos conídios ao atingir 9 horas de incubação, não havendo diferença com relação à testemunha (Tabela 2).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos sobre substâncias antifúngicas e metabólitos secundários produzidos por cepas de *B. subtilis* com capacidade para inibir o crescimento de microrganismos (Foster & Woodruff, 1946; Johnson & Burdon, 1946; Babd et al., 1952; Johnson et al., 1954; Asante & Neal, 1964; Mckeen et al., 1986).

Neste trabalho não foi investigada a natureza química da substância ou metabólitos secundários produzidos pelo isolado, contudo, estudos nesse sentido podem ser iniciados, visando o isolamento do princípio ativo para posterior emprego no controle de *F. equiseti* em condições de campo.

Tabela 1

Diâmetro da zona de inibição do crescimento de *F. equiseti* pela cepa de *B. subtilis*.

Idade da cepa de <i>B. subtilis</i> (Horas)	Diâmetro (mm) das zonas de inibição do crescimento de <i>F. equiseti</i> *
24	20
48	45
72	60
96	60

* média das três repetições

Tabela 2

Germinação dos conídios de *F. equiseti* semeados em *PDA* simultaneamente com *B. subtilis* e 24 horas após a semeadura com *B. subtilis*.

Tempo (horas)	Porcentagem de conídios germinados *		
	<i>B. subtilis</i> + <i>F. equiseti</i>	<i>B. subtilis</i> (24 horas) + <i>F. equiseti</i>	Testemunha
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	41	0	39
8	79	0	70
9	100	0	100

* média das três repetições.

REFERENCIAS

- ABO-EL-DAHAB, M. K. & EL-GOORANI, M. A. (1964). Antagonistic effect of *Bacillus subtilis* strain upon *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 54: 1285-6.
- ALDRICH, JANE & BAKER, R. (1970). Biological control of *Fusarium roseum* F. sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis. Repr.*, 54 (5): 446-8.
- ASANTE, G. E. & NEAL, A. L. (1964). Characterization of fungistatic substances produced by a *Bacillus* antagonistic to *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 54: 819-822.
- BABAD, J.; PINSKY, A.; TURNER-GRAFF, R. & SHARON, N. (1952). An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Nature*, 170: 618-619.
- BASTOS, C. N. & FIGUEIREDO, J. N. de. (1976). Inibição "in vitro" de *Colletotrichum gloeosporoides* Penz., agente causal de antracnose do cajueiro, por uma substância produzida por *Bacillus subtilis* Cohn. *Fitopatologia Brasileira*, 1 (3): 179-182.
- BOOTH, C. (1971). The genus *Fusarium*. Key, Commonwealth Mycological Institute, 237p.
- CLAUS, D. & BERKELEY, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, V. 2, p. 1105-1139.
- DUNLEAVY, J. (1955). Control of damping-off sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 45: 252-258.
- FOSTER, J. H. & WOODRUFF, H. B. (1946). Bacillin, a new antibiotic substance from a soil isolate of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 51: 363-369.
- GORDON, W. L. (1959). The occurrence of *Fusarium* species in Canada. VI. Taxonomy and geographic distribution of *Fusarium* species on plants, insects and fungi. *Can. J. Bot.*, 37: 257-290.
- GORDON, W. L. (1960). The taxonomy and habitats of *Fusarium* from tropical and temperate regions. *Can. J. Bot.*, 38: 643-658.
- JOHNSON, E. A. & BURDON, K. L. (1946). Eumycin - a new antibiotic active against pathogenic fungi and higher bacteria including bacilli of tuberculosis and diphtheria. *J. Bacteriol.*, 51: 591.
- JOHNSON, B. A.; ANKER, A. H. & MALENELY, E. L. (1954). Bacitracin, a new antibiotic produced by a member of the *Bacillus subtilis* group. *Science*, 102: 376-377.
- LIMA, D. M. M. (1988). *Fusarium equiseti* em tomateiro, no Estado de Pernambuco. *Pesq. agropec. bras.*, 23 (2): 207-209.
- MCKEEN, C. D.; REILLY, C. C. & PUSEY, P. L. (1986). Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 76 (2): 136-139.
- NARENDRA, SINGH; SINGH, R. S. (1981). Inhibition of *Fusarium oxysporum* F. sp. *udum* by soil bacteria. *Indian Phytopathology*, 33 (2): 356-359.
- NOBEL, M.; DE TEMPE, J. & NEERGARD, P. (1958). An annotated list of seed borne diseases. *Proc. Intern. Seed Test. Assn.*, 24: 1-159.
- ODIGIE, E. E. & IKOTUM I. (1982). In vitro and in vivo inhibition of growth of *Phytophthora palmivora* by antagonistic microorganisms. *Fitopatologia Brasileira*, 7 (2): 157-168.
- PODILE, A. R. & DUBE, H. C. (1985). Effect of *Bacillus subtilis* on the growth of vascular wilt fungi. *Current Science*, 54 (24): 1282-1283.
- VASUDEVA, R. S. (1952). Investigations of the inhibitory action of *Bacillus subtilis* on *Fusarium udum* Butl., the fungus causing wilt of pigeon-pea. *Ann. Appl. Biol.*, 49: 229-238.