

DORA MARCHIORI SILVA NEVES

**BIOCARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Bacillus cereus*
SELECIONADO PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE ENFERMIDADES
DO TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

DORA MARCHIORI SILVA NEVES

**BIOCARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DE *Bacillus cereus*
SELECIONADO PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE ENFERMIDADES
DO TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de abril de 2005

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Conselheiro)

Prof. José Rogério de Oliveira
(Conselheiro)

Dr. Harllen Sandro Alves Silva

Dr. Luís Otávio Saggion Beriam

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro pela orientação e atenção durante toda a elaboração da dissertação e pelos bons momentos de convívio.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos bons conselhos e orientações.

Aos funcionários do Departamento, pelo carinho com que me receberam e pela enorme ajuda durante toda a execução do meu trabalho.

A todos os amigos, pelo carinho, incentivo, paciência e atenção e a João Antônio, pelo companheirismo.

Aos meus pais, Horizontino e Onésia e meus irmãos, colaboradores incessantes no meu crescimento pessoal.

Ao meu bom Deus, que todos os dias preenche meu coração com alegrias e ânimo.

BIOGRAFIA

Dora Marchiori Silva Neves, filha de Horizontino Neves e Onésia Silva Neves, nasceu em Divinópolis (MG) em 27 de junho de 1968.

Graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (Viçosa - MG) em 1997, quando iniciou o curso de Aperfeiçoamento em Fitobacteriologia pela mesma universidade até o ano de 1999.

Em março de 1999 ingressou no curso de mestrado em Fitossanidade na Universidade Federal de Pelotas (Pelotas - RS), sendo concluído em março de 2001. Neste mesmo ano iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em abril de 2005.

CONTEÚDO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOFISIO- LÓGICA DE UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i>	10
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	14
ORIGEM, CULTIVO E PRESERVAÇÃO DO MICRORGANISMO	14
CURVA DE CRESCIMENTO	14
MORFOLOGIA E REAÇÃO DE GRAM	15
FORMAÇÃO DE ENDÓSPOROS	16
RELAÇÃO COM O OXIGÊNIO LIVRE	16
PRODUÇÃO DE PIGMENTO FLUORESCENTE	17
TERMOESTABILIDADE	17
TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALCALINIDADE	17
HALOFILIA	18
UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO	18
HIDRÓLISE DO AMIDO	18
TESTE DE VOGES- PROSKAUER E VERMELHO DE METILA	19
UTILIZAÇÃO DE CITRATO	19
HIDRÓLISE DE ESCULINA	20
LIQUEFAÇÃO DA GELATINA	20
PRODUÇÃO DE LECITINA	20
PRODUÇÃO DE CATALASE	21
HIDROLISE DO HIPURATO	21

PRODUÇÃO DE H ₂ S	21
TESTE DE OXIDASE	22
TESTE DE UREASE	22
ATIVIDADE DE LIPASE	22
HIDRÓLISE DE TWEEN	22
DEGRADAÇÃO DA FENILALANINA	23
DEGRADAÇÃO DA TIROSINA	23
PRODUÇÃO DE AMÔNIA	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2 - POTENCIAL ANTAGONÍSTICO DE UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i> NO CONTROLE DE PATÓGENOS DO TOMATEIRO	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
ORIGEM, CULTIVO E PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	37
ANTIBIOSE DIRETA – DUPLA CAMADA	38
ANTIBIOSE DIRETA – ESTRIAS	38
INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL	39
COMPOSTOS INIBITÓRIOS VOLÁTEIS	39
INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESPOROS	40
PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS	40
PRODUÇÃO DE QUITINASE	41
PRODUÇÃO DE β- 1,3- GLUCANASE	41
PRODUÇÃO DE PECTINASE	42
PRODUÇÃO DE HCN	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

CAPÍTULO 3 - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO TOMATEIRO POR UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i>	54
RESUMO	54
ABSTRACT	55
INTRODUÇÃO	56
MATERIAL E MÉTODOS	58
MICROORGANISMO E SEU CULTIVO	58
MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES	58
BIOENSAIOS <i>in vitro</i>	58
ÁCIDO INDOL ACÉTICO - AIA	58
SÍNTESE DE ETILENO	59
BIOENSAIOS <i>in vivo</i>	59
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	60
BIOENSAIO DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE UMA FORMULAÇÃO PROPOSTA PARA UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i> , SELECIONADO COMO AGENTE DE BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES DO TOMATEIRO	75
RESUMO	75
ABSTRACT	76
INTRODUÇÃO	77
MATERIAL E MÉTODOS	80
MICROORGANISMO E SEU CULTIVO	80
TESTE DE UMA FORMULAÇÃO QUANTO À VIDA DE PRATELEIRA	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

CAPÍTULO 5 - SISTEMICIDADE DE RESPOSTA INDUZIDA POR UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i> EM PLANTAS DE TOMATEIRO (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.) E FORMA DE DISPENSA DA RIZOBACTÉRIA NA PLANTA	89
RESUMO	89
ABSTRACT	90
INTRODUÇÃO	91
MATERIAL E MÉTODOS	93
MICROORGANISMOS E SEU CULTIVO	93
BIOENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO	93
ENSAIO DE CAMPO	94
RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
CAPÍTULO 6 - SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> DE UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i> A SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E DEFENSIVOS COMERCIAIS UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATEIRO	106
RESUMO	106
ABSTRACT	107
INTRODUÇÃO	108
MATERIAL E MÉTODOS	110
ORIGEM E PRESERVAÇÃO DO MICROORGANISMO	110
ANTIBIOGRAMA	110
SENSIBILIDADE A PRODUTOS DE USO AGRÍCOLA	111
RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
CAPÍTULO 7 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE NEMATÓIDE DAS GALHAS (<i>Meloidogyne incognita</i>) E MURCHA BACTERIANA (<i>Ralstonia solanacearum</i>) EM PLANTAS DE TOMATEIRO POR UM ISOLADO DE <i>Bacillus cereus</i>	119

RESUMO	119
ABSTRACT	120
INTRODUÇÃO	121
MATERIAL E MÉTODOS	124
MICROORGANISMOS E SEU CULTIVO	124
MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES	124
PREPARO DO INÓCULO DE <i>Meloidogyne incognita</i> E INOCULAÇÃO DAS PLANTAS	125
BIOENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO	125
BIOENSAIO EM INFECTÁRIO	125
RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
CONCLUSÕES GERAIS	134

RESUMO

NEVES, Dora Marchiori Silva, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Abril 2005. **Biocaracterização de um isolado de *Bacillus cereus* selecionado para o controle biológico de enfermidades do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: Derly José Henriques da Silva e José Rogério de Oliveira

Experimentos realizados por Silva (2002) objetivando o isolamento e seleção de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica e agentes de biocontrole a múltiplos patógenos resultaram na obtenção de um isolado promissor, selecionado de rizosfera de plantas de tomateiro em cultivo comercial e identificado por análise de ácidos graxos como *Bacillus cereus*. Ensaios em condições de laboratório, casa de vegetação e campo foram realizados neste trabalho visando uma caracterização mais completa do isolado para uma melhor compreensão dos mecanismos de biocontrole envolvidos na interação rizobactéria- fitopatógenos. Testes bioquímicos e morfológicos confirmaram a identificação de espécie para o isolado e demonstraram sua versatilidade fisiológica e nutricional. Ainda, em ensaios laboratoriais, verificou-se a capacidade de utilização de certos antibióticos em estudos de dinâmica populacional de *B. cereus* e sua compatibilidade a pesticidas utilizados na cultura do tomateiro e a adjuvantes utilizados em formulações comerciais. Porém, estudos visando à avaliação da sobrevivência de células de *B. cereus* em uma formulação proposta veiculando o isolado não se mostraram eficientes na manutenção da viabilidade celular. Ensaios de antibiose direta contra diversos fitopatógenos demonstraram que o isolado não inibiu o crescimento da maioria dos isolamentos

patogênicos testados. Em condições controladas, o isolado não promoveu o crescimento de plantas de tomateiro, e também não foi capaz de controlar *Meloidogyne incognita*. Porém foi capaz de aumentar a produtividade na cultura do tomateiro sob cultivo protegido e comprovar a capacidade de indução de resistência em plantas de tomateiro, quando desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Em condições de campo, *B. cereus* não conseguiu controlar a epidemia de *Phytophthora infestans*, mesmo quando diferentes formas de dispensa da rizobactéria foram testadas, e não foi capaz de promover o crescimento de plantas de tomateiro. Em experimento realizado em infectário observou-se uma menor suscetibilidade à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), permitindo que plantas de tomateiro advindas de sementes microbiolizadas com *B. cereus* apresentassem uma menor incidência da doença por um período de 30 dias, quando a severidade da doença igualou-se nos dois tratamentos, demonstrando que o isolado não foi efetivo em controlar a epidemia. Estudos visando a manipulação e otimização de fatores relacionados às habilidades fisiológicas e bioquímicas do isolado fazem-se necessários para o conhecimento e exploração máxima de suas potencialidades, como futuros trabalhos de formulação, possibilitando a obtenção de um produto passível de utilização na produção de culturas de alto valor comercial, minimizando o uso de agrotóxicos e favorecendo a prática de uma agricultura ecologicamente correta.

ABSTRACT

NEVES, Dora Marchiori Silva, D.S. Universidade Federal de Viçosa, April 2005. **Biological characterization of an isolate of *Bacillus cereus* selected for the biological control of diseases of the tomato plant (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee Members: Derly José Henriques da Silva and José Rogério de Oliveira

Experiments carried out by Silva (2002) to isolate and select rhizobacteria inducer of systemic resistance and biological control agents against multiple pathogens resulted in the obtention of a promising isolate. It was selected in the rhizosphere of tomato plants in commercial cultivation and identified by analysis of fatty acids as *Bacillus cereus*. In this work, to get to a more complete characterization of the isolate, essays in laboratory, greenhouse and field conditions were carried out, for a better understanding of the biological control mechanisms involved in the rhizobacteria-phytopathogen interaction. Biochemical and morphological tests confirmed the identification of the species in the isolate, as well as demonstrated its physiologic diversity and nutritional versatility. Moreover, in laboratorial essays, the viability of using determined antibiotics to carry out studies of populational dynamics of the isolate was verified, as well as the compatibility of *B. cereus* to pesticides used on the tomato cultivation and adjuvants used in commercial formulations. But studies to evaluate the survival of *B. cereus* in a formulation containing the isolate did not prove to be efficient to keep the viability of the cells. Essays of direct antibiosis against various phytopathogens showed that the isolate was not efficient to inhibit the growth of the majority of pathogenic isolates tested. Under controlled

conditions, the isolate did not promote the growth of tomato plants, and also did not have the ability to control *Meloidogyne incognita*. But it showed the ability to increase the productivity of the crop in sheltered cultivation, and to prove the induction of resistance in tomato plants, when they were challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Under field conditions, *B. cereus* was unable to control an epidemic of *Phytophthora infestans*, even when various application forms of the rhizobacteria were tested, and it also did not promote the growth of tomato plants. In an experiment carried out in an “infectário” (infested microplot), a less susceptibility to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) was observed, allowing the tomato plants to resist with less incidence of the disease for a period of 30 days in plants grown from microbiolized seeds, although *B. cereus* was not effective to control the epidemic. Studies aiming at handling and optimizing factors related to the physiological and biochemical abilities of the isolate are needed for the understanding and maximum exploitation of its potentialities. For the biological control of diseases in the tomato cultivation, besides further formulation works, there is the probability of obtaining a product that could be used in the production of crops with high commercial value and quality, and that can keep the effectivity of action of this microorganism in the biological control as well as to minimize the use of pesticides encourage the practice of an agriculture ecologically correct.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma solanácea amplamente cultivada em todo o mundo, considerada a hortaliça de maior consumo, podendo ser utilizada tanto *in natura* quanto na forma processada.

No Brasil a área cultivada de tomateiro é de cerca de 50.000 ha/ano, com produção de aproximadamente 3,6 milhões de toneladas (Brasil, 2004).

O cultivo do tomateiro é uma atividade agrônômica intensiva, exigindo uma ampla utilização do espaço físico, o aprimoramento nos tratamentos culturais e a aplicação de insumos e artifícios tecnológicos no controle de plantas invasoras, pragas e doenças.

Um dos fatores limitantes para a produção de tomateiro em muitas partes do mundo é o ataque de fitopatógenos. Cerca de 200 doenças, de diversas causas e etiologias acometem a cultura, tornando-se o emprego sistemático de defensivos químicos na produção em escala comercial uma prática obrigatória (Tigchelaar, 1993; Vale et al., 1992), juntamente com a utilização de cultivares expressando resistência genética e o manejo cultural da planta (Emmert e Handelman, 1990).

A despeito da lucratividade e abastecimento do mercado com alimentos de alta qualidade, problemas advindos do uso indiscriminado de agrotóxicos tem levado a reflexos nocivos ao ambiente (Campanhola e Bettiol, 2003), problemas à saúde humana (Pommery et al., 1993; Roloff et al., 1992), toxidez em relação a organismos não-alvo (Melo e Azevedo, 1998; Brock, 2003; Campanhola e Bettiol, 2003; Gerhardson, 2002; Kasai et al., 1993; Marchini et al., 1988) e o

desenvolvimento de resistência em estirpes patogênicas (Melo et al., 2002; Moreira e Siqueira, 2002; McManus et al., 2002).

Uma alternativa ao emprego de pesticidas na agricultura moderna tem sido a busca por organismos benéficos ao desenvolvimento de plantas, como o uso de bactérias como inoculantes em leguminosas (Atlas e Bartha, 1946; Brock, 2003; Valarini, 1998), a ação de microrganismos na promoção do crescimento (Bashan, 1998; Cattelan et al., 2000; Chen et al., 1996; Gutierrez- Mañero et al., 2001) e indução de resistência em plantas (Cavalcanti et al., 2004; Silva et al., 2004) e como agentes de biocontrole (Thomashow e Weller, 1988; Bettiol, 1991; Melo e Azevedo, 1998; Emmert e Handelsman, 1999; Sabaratnam e Traquiar, 2002; Silva, 2002).

O mercado global de pesticidas já comercializa produtos biológicos, como os biofungicidas que representam cerca de 21% do volume de vendas, utilizando microrganismos dos gêneros *Agrobacterium*, *Peniophora*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* e *Streptomyces*, bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915, *Bacillus sphaericus* Meyer e Neide, 1904, *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp, além de ativadores de resistência e misturas de nutrientes com extratos de microrganismos (Cavalcanti et al., 2004; Melo e Azevedo, 1998; Campanhola e Bettiol, 2003). Contudo, a complexidade dos modos de ação dos agentes de biocontrole e da interação microbiota- solo, a dependência do antagonista em relação ao ambiente (Gerhardson, 2002) e a exposição ambiental a pesticidas e outras substâncias tóxicas utilizadas na agricultura têm dificultado o uso de microrganismos no controle de doenças de plantas.

No campo da pesquisa a busca por isolados mais eficazes, o aprimoramento e otimização dos processos relacionados à produção

em escala agro-industrial e estudos de formulação e aplicação em campo tem sido preocupações constantes, objetivando a validação e correta implementação das metas de produção, formulação e liberação de agentes microbianos no ambiente, no sentido de prover equilíbrio e eficácia ao processo.

O estudo de risco à qualidade ambiental, o conhecimento da estrutura e funções dos ecossistemas envolvidos, os fatores que influenciam a atuação de um agente de biocontrole e suas várias interações (antagonista-planta; antagonista-patógeno; antagonista-organismos não alvo), o desenvolvimento de tecnologias de veiculação destes organismos e a reformulação dos sistemas de produção podem impulsionar novas descobertas na área, promovendo um aumento no uso e comercialização de produtos biológicos.

Experimentos realizados por Silva (2002) objetivando o isolamento e seleção de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica e agentes de biocontrole a múltiplos patógenos resultaram na obtenção de um isolado promissor, selecionado de rizosfera de plantas de tomateiro em cultivo comercial e identificado pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana como *Bacillus cereus* Frankland e Frankland, 1887, sendo o perfil comparado por meio do software de identificação microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock* TSBA versão 5.0, Microbial ID, Newak, DE, USA), considerando positivamente identificado o isolado com índice de similaridade maior ou igual a 6,0.

Silva (2002) relata que o isolado foi capaz de aumentar a atividade de enzimas relacionadas à resistência sistêmica induzida como lipoxigenase e peroxidase quando plantas foram desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (ex Okabe 1933) Young, Dye e Wilkie 1978 em um bioensaio em casa de vegetação, proporcionar

aumento na produção de frutos de tomateiro e proteger as plantas de infecções naturais de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 1876, *Alternaria solani* (Ellis e Martin) L. R. Jones e Grout 1896 e *Septoria lycopersici* Speg. 1881, em condições de campo, o que comprova a inespecificidade da resistência sistêmica induzida e revela o potencial de uso deste antagonista em um programa de controle integrado de doenças do tomateiro.

O aumento na atividade de enzimas como peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, lipoxigenase, β -1,3-glucanase e quitinase (Ye et al., 1990; Koch et al., 1992; Schneider e Ullrich, 1994; Van Loon et al., 1997), a atividade antimicrobiana direta na presença de peróxidos de hidrogênio (Ride, 1975), a geração de precursores para a biossíntese de lignina e outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (Klessig e Malamy, 1994), a inibição do crescimento do patógeno pela indução de fitoalexinas e a transdução de sinais (Namai et al., 1990; Li et al., 1991; Choi e Bostock, 1994) além da oxidação de compostos fenólicos a quinonas (Agrios, 1997) podem indicar uma resposta de resistência induzida em plantas por microrganismos.

O gênero *Bacillus* exibe uma grande habilidade e diversidade fisiológica (Sneath et al., 1984) e, dentre suas espécies, várias produzem enzimas hidrolíticas extracelulares (Noel et al., 2001; Planas, 2000), antibióticos (Baker e Cook, 1974; Sneath et al., 1984; Brock, 2003), larvicidas (Melo e Azevedo, 1998), toxinas (Brock, 2003), podendo ser utilizadas nas indústrias alimentícia (Harper, 1982; Moreira e Siqueira, 2002), e agrônômica (Melo et al., 2002; Campanhola e Bettiol, 2003; Bashan, 1998). Responde por, aproximadamente, 50% da comercialização de biopesticidas em todo o mundo, com destaques para programas de biocontrole de insetos

utilizando-se *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus popilliae* Dutky, 1940, *Bacillus lentimorbus* Dutky, 1940, *Bacillus sphaericus* 1904, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg, 1835) Cohn, 1872 e *Bacillus cereus* e produtos a base de *B. subtilis* (Melo et al., 2002) ativo contra vários patógenos fúngicos (Gerhardson, 2002) no controle de doenças de plantas.

Dentro de um programa de controle biológico, o estudo das características fenotípicas de um microrganismo leva ao entendimento dos diversos fatores que regulam sua sobrevivência, capacidade de produção de estruturas de resistência e dormência, sua diversidade fisiológica, eficiência na utilização de substratos e sua susceptibilidade ao antagonismo (Brock, 2003), revestindo-se de importância na busca por um biocontrolador capaz de manter a viabilidade celular e efetividade de ação.

Diante do exposto, este trabalho se propôs a: 1) caracterizar um isolado de *Bacillus cereus* selecionado como indutor de resistência em plantas de tomateiro (Silva et al., 2004), estudando aspectos de ordem fisiológica, bioquímica e morfológica, 2) avaliar o potencial antagonístico de *B. cereus* frente a diferentes patógenos do tomateiro *in vitro*, 3) verificar a capacidade do isolado em promover o crescimento e aumentar a produtividade de plantas de tomateiro, em casa de vegetação e campo, 4) avaliar o potencial de uma formulação proposta veiculando o isolado, 5) testar a capacidade da rizobactéria em proteger o tomateiro contra *Phytophthora infestans* em condições de campo, 6) avaliar a magnitude do potencial de compatibilidade entre defensivos químicos, agentes antimicrobianos e o antagonista selecionado, 7) e testar a capacidade de *Bacillus cereus* em proteger o tomateiro contra patógenos do sistema radicular, em condições de casa de vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. New York: Academic Press, 1997. 665p.

Atlas, R. M., Bartha, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**. Menlo Park, California: Wesley Longman, Inc. 1946. 694 p.

Baker, K. F., Cook, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman. 1974. 433 p.

Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729- 770. 1998.

Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA. 1991. 388 p.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Agricultura Brasileira em números, Anuário 2003** – Produção Agrícola: Lavouras temporárias e permanentes. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em dezembro de 2004.

Brock, T. D. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. 2003. 1019 p.

Campanhola, C., Bettiol, W. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2003. 279 p.

Cattelan, A. J., Hartel, P.G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG. 2000, p.213- 234.

Cavalcanti, L.S.; Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Santos, F.S., Costa, J.C.B., Ferreira, J.B., Araújo, D.V., Muniz, M.F.S., Deuner, C.C., Miranda, J.C. **Ativadores de resistência disponíveis comercialmente**. In: Anais da II Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas, UFLA, Lavras, 2004, p. 82- 97.

Chen, Y., Mei, R., Lu, S. Liu, L.; Kloepper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: R. S. G. Utkhede, V.K. (Ed.). **Management of Soil Borne Diseases**. New Delhi: Kalyani Publishers, 1996, p.165- 184.

Choi, D., Bostock, R. M. Involvement of de novo protein synthesis, protein kinase, extracellular Ca^{2+} and lipoxygenase in arachidonic acid induction of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl co-enzyme A reductase genes and isoprenoid accumulation in potato. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1237- 1244, 1994.

Emmert, E. A. B., Handelsman, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v.171, p.1- 9. 1999.

Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.338- 343. 2002.

Gutierrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206- 211. 2001.

Harper, H. A. **Manual de Química Fisiológica**. São Paulo: Atheneu. 1982. 736 p.

Kasai, F., Takamura, N., Hatakeyama, S. Effect of smetryne on growth of various freshwater algal taxa. **Environmental Pollution**, v.79, p.77- 83. 1993.

Klessig, D. F., Malamy, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Molecular Biology**, v.26, n.5, p.1439- 1458. 1994.

Koch, E., Meier, B. M., Eiben, H. G., Slusarenko, A. A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. **Plant Pathology**, v.99, p.571- 576, 1992

Li, W. X., Kodama, O., Akatsuka, T. Role of oxygenated fatty acids in rice phytoalexin production. **Agricultural Biology Chemistry**, v.55, p.1041- 1047, 1991.

Marchini, S., Passerini, L., Cesareo, D., Tosato M. L. Herbicidal triazines: Acute toxicity on *Daphnia*, fish and plants and analysis of its relationships with structural factors. **Ecotoxicological and Environmental Safety**, v.16, n.2, p.148- 57. 1988.

Mcmanus, P. S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Review Phytopathology**, v.40, p.443-465. 2002.

Melo, I. S., Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA- CNPMA, v.1. 1998. 262 p.

Melo, I. S., Valadares-Inglis, M. C., Nass, L. L., Valois, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismos**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA - Meio Ambiente. 2002. 743 p.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, MG: Editora UFLA. 2002. 626 p.

Namai, T., Kato, T., Yamaguchi, Y., Togashi, J. Time- course alteration of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. **Annals Phytopathology Society Japan**, v.56, p26- 32, 1990.

Noël, G. M. A. M., Madrid, E. A., Bottini, R., Lamattina, L. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato- *Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.815- 823. 2001.

Planas, A. Bacterial 1,3- 1,4- L- glucanases: structure, function and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1543, p.361- 382. 2000.

Pommery, J., Mathieu, M., Mathieu, D., Lhermitte, M. Atrazine in plasma and tissue following atrazine- amino- triazole- ethylene glycolformaldehyde poisoning. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v.31, p.323- 31. 1993.

Ride, J. P. Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. **Physiology Plant Pathology**, v.5, p.125- 134, 1975.

Roloff, B. D., Belluck, D. A., Meisner, L. F. Cytogenic studies of herbicide interactions *in vitro* and *in vivo* using atrazine and linuron. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.22, p.267- 671. 1992.

Sabaratnam, S., Traquiar, J. A. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Tomato Transplants. **Biological Control**, v.23, p.245- 253. 2002.

Schneider, S., Ullrich, W. R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.43, p.57- 67, 1994.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliare e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Sneath, P.H.A., 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore, Md., pp: 1104- 1139.

Thomashow, L. S., Weller, D. M. Role a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal Bacteriology**, v.170, p.3499- 508. 1988.

Tigchelaar, E. C. Botany and culture of tomato. In: Jones, J. B., Stall, R. E., Zitter, T. A. (eds.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, New York, 1993. p. 2- 4.

Valarini, M. J. Base Molecular da Interação *Rhizobium*- Leguminosa. In: I. S. Melo, Azevedo, J. L. (eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, SP: Embrapa- CNPMA, 1998. p.311- 326.

Vale, F. X. R., Zambolim, L., Chaves, G. M., Correia, L. G. Avaliação fitossanitária da cultura do tomateiro em regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 753- 765. 1992.

Van Loon, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753- 765. 1997.

Ye, X. S., Pan, S. Q., Kuc, J. Association of pathogenesis-related proteins and activities of peroxidase, β - 1,3 glucanase and quitinase with systemic induced resistance to blue mould of tobacco but not to systemic tobacco mosaic virus. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.36, p.523- 531, 1990.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MORFOFISIOLÓGICA DE UM ISOLADO DE *Bacillus cereus*

RESUMO

Experimentos realizados por Silva (2002) objetivando o isolamento e a seleção de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica e agentes de biocontrole a múltiplos patógenos resultaram na obtenção de um isolado promissor, selecionado de rizosfera de plantas de tomateiro em cultivo comercial e identificado por análise de ácidos graxos como *Bacillus cereus*. O presente trabalho objetivou a caracterização deste isolado de *B. cereus*, através de estudos envolvendo aspectos de ordem fisiológica, bioquímica e morfológica, visando o conhecimento e exploração máxima das potencialidades do isolado para o biocontrole de doenças na cultura do tomateiro, além de futuros trabalhos de formulação. *Bacillus cereus* foi caracterizado como um procarioto Gram positivo, com células em formato de bastão e capacidade de formação de um endósporo por célula, anaeróbio facultativo, com período de geração de 22 minutos, capaz de tolerar grandes variações de pH, temperatura e concentrações do sal cloreto de sódio (NaCl). O isolado foi capaz de utilizar 69 diferentes fontes de carbono, hidrolisar amido, esculina, hipurato, Tween, produzir lecitina, catalase, degradar lipídeos, liquefazer a gelatina e demonstrou resposta positiva para os testes de oxidase e urease. Os testes bioquímicos de produção de pigmento fluorescente, teste de Voges-Proskauer e vermelho de metila, produção de H₂S e amônia, degradação da fenilalanina e tirosina e utilização de citrato tiveram resultados negativos.

BIOCHEMICAL MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF A *Bacillus cereus* ISOLATE

ABSTRACT

Experiments carried out by Silva (2002) to isolate and select rhizobacteria inducer of systemic resistance and biological control agents against multiple pathogens resulted in the obtention of a promising isolate. It was selected in the rhizosphere of tomato plants in commercial cultivation and identified by fatty acids analysis as *Bacillus cereus*. The objective of the present work was to characterize this *B. cereus* isolate, studying physiological, biochemical and morphological aspects, viewing the understanding and maximum exploitation of the potentialities of the isolate for the biological control of diseases in the tomato plant cultivation as well as further works of formulation. *Bacillus cereus* was characterized as a Gram positive prokaryote, with cells in the shape of a stick and ability to form one endospore per cell. It is anaerobious facultative, with a generation period of 22 minutes, being able to tolerate great variations of pH, temperature and concentrations of salt (sodium chloride - NaCl). The isolate was able to use 69 different sources of carbon, to hydrolyze starch, esculine, hippurate and Tween; to produce lecithin and catalase; to degrade fats, to liquefy gelatin, showing a positive response to the oxidase and urease tests. The biochemical tests of production of fluorescent dye, test of Voges-Proskauer and methyl red, production of H₂S and ammonia, degradation of phenylalanine and tyrosine, and the use of citrate showed negative results.

INTRODUÇÃO

O metabolismo central de um organismo é fundamentado em reações bioquímicas capazes de produzir ou consumir energia. Estes processos são controlados por eventos intracelulares que iniciam pela transcrição gênica até a síntese de proteínas com função enzimática, catalisando alterações no substrato, permitindo assim a utilização de rotas metabólicas específicas para a liberação de energia.

A presença de um microrganismo em determinado ambiente é função das condições locais dominantes e dos limites de sua bagagem genética. Seu sucesso em qualquer habitat é regulado pela extensão e rapidez de suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes, podendo ocorrer limitações físicas e químicas que podem ser suplantadas, pois muitas espécies são capazes de se adaptar as novas condições (Moreira e Siqueira, 2002).

O estudo das peculiaridades nutricionais e metabólicas de microrganismos leva ao conhecimento de seu metabolismo geral e, conseqüentemente, ao entendimento dos diversos fatores que regulam sua sobrevivência, capacidade de produção de estruturas de resistência e dormência, sua diversidade fisiológica e eficiência na utilização de substratos e sua susceptibilidade ao antagonismo (Brock, 2003).

Ensaio como curva de crescimento, morfologia, utilização de açúcares, entre outros, são empregados para caracterizar um microrganismo e melhor conhecer suas habilidades frente às condições ambientais predominantes, além de fornecer subsídios para a condução de experimentos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O tamanho e forma das células são características morfológicas úteis na identificação, podendo ser influenciadas pelas condições

ambientais. Especula-se que a maior concentração de células Gram-positivas em solo não rizosférico possa se dar devido a maior espessura de sua parede celular, conferindo maior resistência a condições adversas (Moreira e Siqueira, 2002).

Espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* exibem uma grande habilidade e diversidade fisiológica (Sneath et al., 1984) com produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (Noel et al., 2001; Planas, 2000), antibióticos (Baker e Cook, 1974; Sneath et al., 1984; Brock, 2003), larvicidas (Melo e Azevedo, 1998) e toxinas (Brock, 2003). Aplicações nos setores alimentício (Harper, 1982; Moreira e Siqueira, 2002) e agrícola (Melo et al., 2002; Campanhola e Bettioli, 2003; Bashan, 1998; Gerhardson, 2002) tem também demonstrado o grande potencial e versatilidade no uso deste microrganismo.

Neste trabalho são apresentados estudos de ordem fisiológica, bioquímica e morfológica de um isolado de *Bacillus cereus*, selecionado como agente de biocontrole em plantas de tomateiro, em trabalhos anteriores do mesmo laboratório (Silva, 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Origem, cultivo e preservação do microrganismo

Utilizou-se para a condução de todos os experimentos um isolado bacteriano, previamente identificado por análise de perfil de ácidos graxos como *Bacillus cereus* (Silva, 2002), obtido de rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG). Este isolado foi selecionado em experimentos de casa de vegetação e campo, mostrando-se efetivo em induzir resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em tomateiro (Silva et al., 2004).

O cultivo do microrganismo se deu por repicagem em placas de Petri contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970) sólido para uma produção massal de células bacterianas em fase exponencial de crescimento. Após o período de incubação e crescimento, células foram coletadas pela adição de solução salina (0,85%) às placas e o auxílio de alça de Drigalski, obtendo-se uma suspensão bacteriana que foi padronizada em espectrofotômetro ($OD_{540} = 0,5$).

A preservação foi feita pela utilização das técnicas de solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer -80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo-a-tubo (Király et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a -4°C (Williams e Wellington, 1982).

Curva de crescimento

O isolado foi cultivado em meio 523 líquido por 24 horas a 28°C e, após o período de incubação, uma alíquota de $200\mu\text{L}$ foi transferida para um Erlenmeyer contendo 200mL do mesmo meio. O Erlenmeyer foi então colocado sob agitação em agitador horizontal a 140 ciclos, de

onde foram retiradas alíquotas às 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 16, 19, 21 e 32 horas de crescimento, procedendo-se a diluições seriadas (fator 10) em solução salina (0,85% NaCl) contendo 0,3% de Tween 80 (Romeiro, 2001). Alíquotas de 50 μ L destas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio 523 sólido e incubadas por 24 horas a 28°C. Ao final do período de incubação contou-se o número de células viáveis (UFC/mL) obtido em cada uma das placas. Foram feitas três repetições para cada uma das diluições (Klement et al., 1990).

Nos mesmos intervalos de tempo utilizados para o semeio em placas, alíquotas das diluições foram utilizadas para a determinação da absorbância em espectrofotômetro (Hitachi, U- 3000) sob comprimento de onda de 540nm (Klement et al., 1990).

As avaliações correspondentes entre número de células viáveis (UFC/mL) após o período de incubação e as respectivas leituras de absorbância ao longo do tempo foram registradas, visando a construção da curva padrão de crescimento bacteriano, obtida através da média das três repetições de cada placa e seu valor de absorbância respectivo, utilizando-se, para este fim, o fator de diluição com menor desvio padrão.

Morfologia e Reação de Gram

Utilizou-se uma cultura com 24 horas de crescimento em meio 523 líquido para realizar os testes de coloração de Gram (Schaad et al., 2001) e solubilidade em KOH (Fahy e Persley, 1983).

Para observação da morfologia celular, esfregaços do isolado foram submetidos à coloração de Benians (Conn et al., 1957) e visualizados sob microscopia ótica.

Foram empregados os métodos de Gram, Benians e verde malaquita (Schaad et al., 2001) para a determinação das dimensões celulares, com o auxílio de uma câmera Olympus U- CMAD- 2 acoplada a microscópio ótico Olympus DX60. Utilizando-se o programa ImagePro Plus, mediu-se o comprimento e largura de 5 células por lâmina, perfazendo um total de 15 células, escolhendo-se células que não apresentaram evidências de divisão celular. Esporos foram também medidos, tanto os localizados no interior quanto no exterior das células.

Formação de endósporos

Bacillus cereus foi repicado para um Erlenmeyer contendo meio de Finley e Fields (Finley e Fields, 1962) líquido e, após incubação a 28°C por 7 dias, preparou-se o esfregaço de células em lâminas de vidro procedendo-se à coloração com verde malaquita e safranina (Schaad et al., 2001). A existência e características morfológicas do endósporo foram visualizadas ao microscópio ótico, utilizando-se lente de imersão (1000X).

Relação com o oxigênio livre

Bacillus cereus com 24 horas de idade foi repicado para placas de Petri contendo o meio 523 sólido, pelo método de estrias. As placas foram colocadas em jarra de anaerobiose contendo o reagente Anaerocult® A (Merck) e o conjunto incubado a 28°C por 24 horas. A ocorrência de crescimento bacteriano demonstra que o isolado é capaz de se multiplicar em um ambiente anaeróbio (Schaad et al., 2001).

Produção de pigmento fluorescente

O isolado foi cultivado em meio 523 líquido por 24 horas a 28°C e então repicado para tubo de ensaio contendo meio King B sólido (King et al., 1954), sendo incubado a 28°C por, até, 72 horas. As avaliações foram feitas a cada 24 horas sob luz UV com comprimento de onda de 366nm (Schaad et al., 2001).

Termoestabilidade

Para avaliar a capacidade do isolado em multiplicar-se sob diferentes temperaturas utilizou-se a metodologia descrita por Fahy e Persley (1983) com modificações. De um cultivo líquido de *Bacillus cereus* retiraram-se alíquotas de 500 µL que foram dispensadas em tubos contendo 4,5 mL de meio 523 líquido, sendo estes incubados às temperaturas de 28°C, 37°C e 70°C em banho- maria, nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Para cada combinação tempo- temperatura, procedeu-se a diluições de fator 10 em solução salina (0,85% NaCl). Cada diluição foi semeada em placas de Petri contendo meio 523 sólido com posterior incubação a 28°C por 24 horas, quando então se fez a contagem do número de células viáveis (UFC/mL) por placa, com três repetições para cada uma das diluições.

Tolerância à acidez e alcalinidade

Em Erlenmeyers contendo meio 523 líquido preparado sob os tampões acetato, fosfato e Tris-HCl (Dhingra e Sinclair, 1985) cultivou-se *Bacillus cereus* sob uma ampla faixa de pH (4,3 a 10,0) com incubação a 28°C por 5, 7, 9, 13, 19 e 32 horas. Através da medição da turbidez do meio ao final de cada tempo de incubação, determinou-se o número de células totais do isolado através de

leituras em espectrofotômetro (OD₅₄₀). Os tempos de incubação foram escolhidos observando-se os valores da curva padrão de crescimento do microrganismo.

Halofilia

Avaliou-se a capacidade de sobrevivência do isolado, quando diferentes concentrações do sal NaCl (2,0 a 10,0%) foram adicionadas a Erlenmeyers contendo meio 523 líquido. *Bacillus cereus* foi repicado e cultivado a 28°C por 5, 7, 9, 13, 19 e 32 horas, fazendo-se todas as combinações possíveis entre as diferentes concentrações e tempos de cultivo. Após cada um dos referidos tempos de incubação a turbidez do meio foi avaliada em espectrofotômetro (OD 540 nm). Os tempos de incubação foram escolhidos seguindo-se a curva padrão obtida para o isolado em questão (Fahy e Persley, 1983).

Utilização de diferentes fontes de carbono

O antagonista com 24 horas de idade, crescido em meio 523 líquido foi semeado em placas de Petri contendo meio Biolog Universal Growth (Biolog[®]). Após incubação a 28°C por 24 horas, uma suspensão do antagonista foi preparada com a adição de solução salina (0,85%), ajustada em espectrofotômetro (OD₅₄₀ = 0,5) e alíquotas depositadas em placas GP Microplate[™]. Seguiu-se a incubação das placas a 28°C por 18 e 24 horas, sendo que ao final dos tempos de incubação, fez-se a avaliação visual do aparecimento de coloração púrpura nos poços referentes a cada uma das fontes de carbono (Biolog, 1999).

Hidrólise do amido

Partindo-se de uma cultura com 24 horas de crescimento em meio 523 líquido, repicou-se o isolado por meio de pontos em ágar nutritivo contendo 2% de amido solúvel previamente vertido em placa de Petri. Seguiu-se a incubação a 28°C por 4 dias, quando a placa foi submetida a inundação com solução de lugol, por aproximadamente 1 minuto, avaliando-se a ocorrência de halo ao redor da colônia (Schaad et al., 2001), característico da ação de amilases.

Teste de Voges-Proskauer e vermelho de metila

Cultivo bacteriano de *B. cereus* com 24 horas de crescimento em meio 523 líquido foi utilizado para a retirada de uma alíquota que foi semeada em tubos de ensaio contendo meio MR-VP (vermelho metila – Voges Proskauer). Para o teste de Voges Proskauer, o isolado foi incubado por 5 dias a 28°C sendo testado aos 2 e 5 dias de cultivo, adicionando-se a tubos de ensaio estéreis 1 mL de cultura, 0,6 mL de naftol (5%) e 0,2 mL de KOH (40%) com posterior agitação por 2 horas. A viragem da coloração do líquido contido no tubo de ensaio para uma cor rósea indica que o teste é positivo (Fahy e Persley, 1983).

Para o teste de vermelho de metila, após incubação por 72 horas a 28°C dos tubos de ensaio contendo células de *Bacillus cereus* crescidas em meio MR-VP, foi retirado 1mL do meio de cultivo, dispensado em tubo de ensaio e adicionadas 5 gotas de solução de vermelho de metila 0,02%. O desenvolvimento de coloração vermelha no tubo indica teste positivo (Fahy e Persley, 1983).

Utilização de citrato

Meio de Simmons (Simmons, 1926) foi utilizado para avaliar a capacidade do isolado em utilizar citrato como única fonte de carbono. Para tal, suspensão de células de *Bacillus cereus* obtida a partir de crescimento em meio 523 sólido foi utilizada para semeio em placas de Petri contendo meio de Simmons. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas, procedendo-se à observação de crescimento bacteriano e mudança de coloração do meio, sendo indicativo do uso de citrato (Schaad et al., 2001).

Hidrólise de esculina

Meio de esculina de Sneath foi utilizado para avaliar a capacidade do isolado em originar um complexo de cor escura, não fluorescente, através da reação da esculina com íons ferro. Para tal, o isolado foi semeado em tubo de ensaio contendo o referido meio, utilizando-se uma suspensão bacteriana com 24 horas de idade. Seguiu-se à incubação a 28°C por 7 dias, procedendo-se, a cada 24 horas, a observação de mudança de coloração do meio, indicativo do uso de hidrólise de esculina (Mariano, 2000).

Liquefação da gelatina

Em tubos de ensaio contendo meio caldo nutritivo adicionado de 12% de gelatina, procedeu-se ao semeio do isolado com alça de platina reta, partindo-se de uma cultura com 24 horas de idade. Após 4 dias de incubação a 28°C, o tubo de ensaio contendo o crescimento bacteriano foi levado a geladeira por 30 minutos e a seguir inclinado para observar a liquefação ou não do meio (Blazevic e Ederer, 1975).

Produção de lecitina

Sobre a superfície de placas de Petri contendo meio nutriente ágar previamente adicionado de gema de ovo (proporção 1/10), o

isolado foi repicado em pontos eqüidistantes e incubado a 28°C por 24 horas. A avaliação consistiu da observação de formação de halo ao redor das colônias surgidas após incubação (Fahy e Persley, 1983).

Produção de catalase

Após a obtenção de células de *B. cereus* cultivadas em placas de Petri contendo meio 523 sólido por 24 horas a 28°C, gotas de peróxido de hidrogênio (3%) foram adicionadas as placas, seguindo-se a observação da formação de bolhas, considerando-se o teste com este resultado como positivo (Romeiro, 2001).

Hidrolise do hipurato

Uma alíquota do isolado com 24 horas de crescimento em meio 523 líquido foi semeada em um meio de cultivo líquido adicionado de hipurato de sódio (10g/L) e cloreto de cálcio (0,3g/L) sendo cultivada a 30°C por 7 dias. Após o período de incubação, foram adicionados 1,25 mL de uma solução de FeCl₃ a 7% e observado o aparecimento de um precipitado permanente, que indica que o antagonista foi capaz de hidrolisar hipurato (Romeiro, 1976).

Produção de H₂S

Cultivo bacteriano com 24 horas de idade foi repicado para tubos de ensaio contendo meio de Dye (1968) e uma tira de papel de filtro embebida com solução saturada de acetato de chumbo foi presa em cada um dos tubos, de modo que esta ficasse suspensa sem tocar o meio de cultura. Os tubos de ensaio foram então incubados a 28°C por até 14 dias, sendo avaliados diariamente quanto ao escurecimento da tira de papel, indicativo da produção de H₂S pelo isolado (Fahy e Persley, 1983).

Teste de oxidase

Após embeber tiras de papel de filtro (Whatmann) com solução de dimetil- p- fenil- N- diamina HCl (0,5%), células do isolado com 24 horas de idade foram recolhidas com o auxílio de um bastão de vidro, sendo utilizadas para proceder ao esfregaço nas tiras. Após 10 segundos, o aparecimento de coloração rosa indica que o isolado é produtor de oxidase (Blazevic e Ederer, 1975).

Teste de urease

A hidrólise da uréia pode ser detectada por uma variação no pH que é visualizada pela mudança na coloração do meio de cultivo.

O isolado bacteriano foi cultivado em meio de Dye (1968) adicionado de solução de uréia (2%) por 24 horas a 28°C. Utilizaram-se dois tubos, sendo que o controle não continha a fonte de uréia. Após o tempo de incubação, avaliou-se o aumento ou não da alcalinidade do meio (Fahy e Persley, 1983).

Atividade de lipase

Em placas de Petri contendo meio nutriente ágar adicionado de CaCl₂ (0,01%) e Tween 80 (1% na concentração final), cultivou-se o isolado bacteriano por até 7 dias, aguardando o aparecimento de halo opaco ao redor da colônia, indicativo de teste positivo (Gerhardt, 1994).

Hidrólise de Tween

A atividade de esterase pela bactéria foi avaliada segundo metodologia descrita por Sands (Klement et al., 1990). Para tal o isolado foi repicado em placas de Petri contendo meio nutriente ágar adicionando-se cloreto de cálcio (0,01%) e Tween 80 (0,1% na

concentração final) e incubadas a 28°C por até 7 dias. O aparecimento de uma zona opaca formada ao redor da colônia, contendo grânulos de cristais é característico da formação de um polímero, quando o ácido oléico é hidrolisado a partir de Tween.

Degradação da fenilalanina

A capacidade do isolado em degradar a fenilalanina foi avaliada, cultivando-se a bactéria em placas de Petri contendo meio de cultivo adicionado de fenilalanina (0,2%) por 72 horas a 28°C. Após o período de incubação, gotas de FeCl₃ (10%) foram adicionadas a placa, aguardando-se o aparecimento de uma reação de coloração esverdeada, comprovando assim a produção de ácido fenilpirúvico a partir de fenilalanina (Klement et al., 1990).

Degradação da tirosina

Em placas de Petri contendo ágar nutriente adicionado de tirosina (0,5%), repicou-se o isolado em pontos com o auxílio de alça de platina, cultivando-se a bactéria a 28°C por até 7 dias, avaliando a mudança de coloração do meio ao redor da colônia, pela produção de pigmento de tonalidade marrom, indicativo da capacidade do isolado em degradar a tirosina (Klement et al., 1990).

Produção de amônia

Partindo-se de cultivo bacteriano com 24 horas de crescimento repicou-se o isolado em tubos de ensaio contendo meio MB16, incubando-se a 28°C por até 5 dias. Após este período, uma alíquota do meio foi retirada, dispensada em tubo de ensaio vazio e um mesmo volume de reativo de Nessler foi adicionado, aguardando o aparecimento de um precipitado amarelo, caracterizando o isolado como produtor de amônia (Romeiro, 1976).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes de coloração de Gram e solubilidade em KOH identificaram o isolado como Gram positivo.

O isolado em teste iniciou sua fase logarítmica de crescimento 5:00 horas após repicagem para meio padrão (Figura 1), com um período de geração de 22,00 minutos.

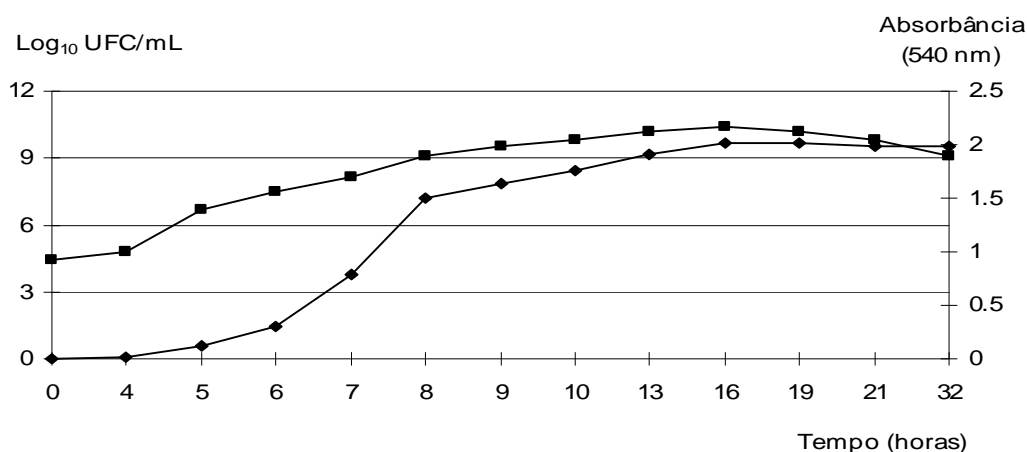


Figura 1. Curva de crescimento de um isolado de *Bacillus cereus* em valores expressos de log₁₀UFC/mL (□) e absorbância lida a 540 nm (◇).

A avaliação da capacidade do isolado em se multiplicar na ausência de O₂ comprovou que a rizobactéria comporta-se como anaeróbia facultativa, em conformidade com a descrição para a espécie (Schaad et al., 2001).

Sob microscopia ótica podem-se observar células vegetativas em formato de bastão (Figuras 1 e 2) medindo 3,38µm de comprimento e células esporogênicas com a formação de um endósporo por célula (Figuras 2 e 3). O endósporo tem um formato oval, posiciona-se no centro da célula e mede 0,96µm de comprimento.

Segundo Sneath et al. (1984) algumas estirpes de *Bacillus cereus* e *B. subtilis* excretam pigmentos fluorescentes, não se observando tal característica neste isolado de *B. cereus*.



Figura 2. Células de *Bacillus cereus* visualizadas pelas técnicas de coloração de Benians (Foto 1), Gram (Foto 2) e verde malaquita (Foto 3), evidenciando a presença de células vegetativas e esporogênicas.

Experimentos para avaliação da capacidade do isolado em resistir a extremos de temperatura, pH e salinidade revelaram ser ele capaz de crescer sob temperaturas de 28°C e 37°C nos três intervalos de tempo avaliados e por 48 horas a 70°C, em banho- maria (Figura 3). Demonstrou ser capaz de crescer em meio de cultivo com pH entre 5,5 e 9,0 (Figura 4) e de tolerar concentrações de até 6% do sal cloreto de sódio, quando este foi incorporado ao meio de cultivo (Figura 5).

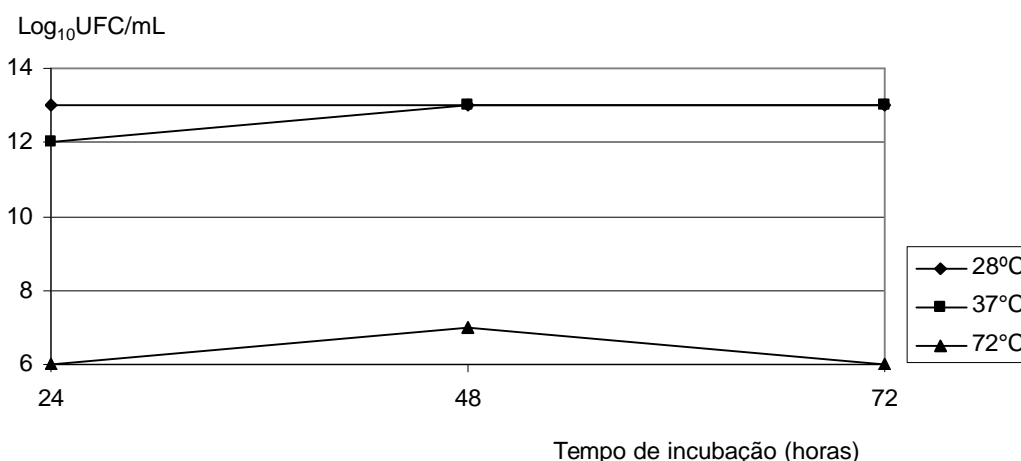


Figura 3. Influência de diferentes combinações de tempo e temperatura na sobrevivência de células de *Bacillus cereus* crescidas em um meio padrão.

O fenômeno da termofilia é uma característica de procariotos (Caldwell, 1999), que se manifesta no gênero *Bacillus*. A resistência de esporos do gênero a altas temperaturas é marcante sendo relatado que um tratamento térmico a 70°C por 10 minutos em um meio de cultivo contendo células bacterianas destrói células vegetativas de quase todas as bactérias conhecidas, diferentemente do que acontece com esporos de *Bacillus* (Sneath et al., 1984), fenômeno este que pôde ser observado neste isolado de *B. cereus*.

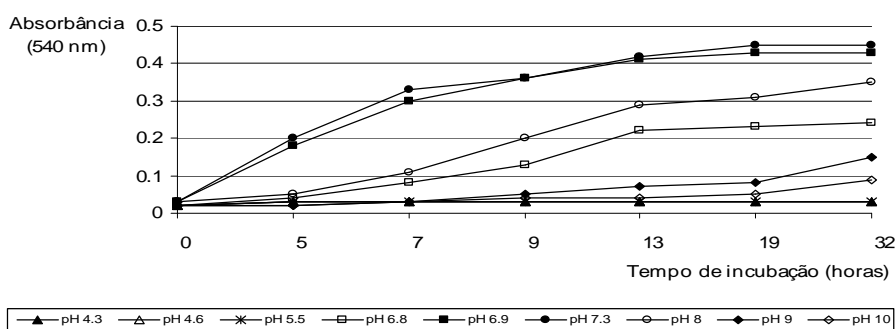


Figura 4. Influência do pH de um meio padrão contendo células de *Bacillus cereus* após incubação a 28°C por até 32 horas.

Embora a maioria das bactérias multiplique-se melhor em pH próximo da neutralidade, alguns microrganismos crescem a valores de pH substancialmente diferentes de 7,0, como é o caso de espécies de *Thiobacillus* por exemplo, que suportam valores de pH abaixo de 2,0 e *Bacillus alcalophilus* Vedder 1934, que pode crescer a valores de pH próximos a 10,5 (Caldwell, 1999).

Os resultados dos testes bioquímicos realizados para a caracterização do isolado estão sumarizados na Tabela 1.

A avaliação da capacidade do isolado em utilizar diferentes fontes de carbono empregando o kit Biolog[®], mostrou que o organismo foi capaz de utilizar 69 diferentes açúcares, excetuando-se arbutina, L- fucose, D- galactose, D- ácido galacturônico, D- ácido glucônico, m- inositol, D- manitol, D- melezitose, D- melibiose, β- metil- D-

galactosídeo, D- rafinose, L- ramnose, salicina, sedoheptulosana, D- sorbitol, staquiose, xilitol, D- xilose, ácido acético, γ - ácido hidrobutírico, ácido- p- hidroxifenilacético, ácido succínico mono- metil éster, ácido succinâmico, ácido succínico, putrescina, 2,3- butanodiol, α - D- glucose- 1- fosfato, demonstrando sua ampla habilidade fisiológica (Sneath et al., 1984; Brock, 2003; Atlas e Bartha, 1946).

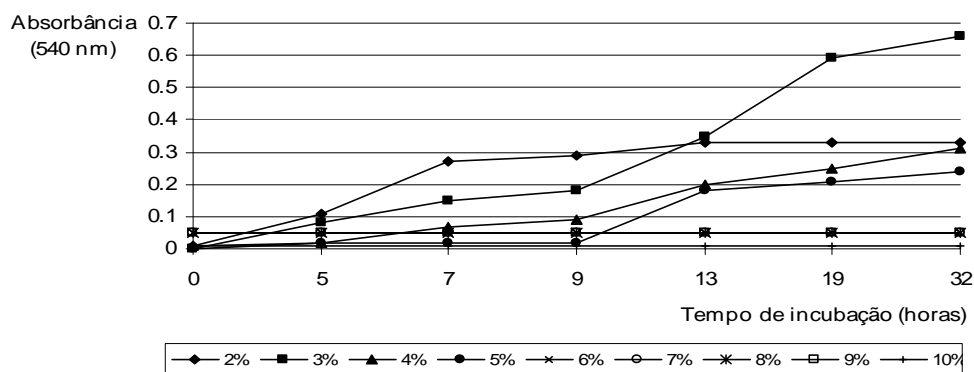


Figura 5. Suscetibilidade de células de um isolado de *Bacillus cereus* crescido em um meio padrão após incubação sob diferentes concentrações do sal NaCl.

Bacillus cereus pode ser facilmente detectado em meio de cultivo contendo lecitina, com crescimento de colônias rizóides e formação de halo ao seu redor (Sneath et al., 1984). A liberação de um diglicerídeo pela lecitina foi verificada através da turvação do meio em que o isolado foi crescido.

Brown, citado por Blazevic e Ederer (1975), explorou pela primeira vez o uso de citrato de sódio para o crescimento de microrganismos, e observou que certos isolados tinham seu crescimento aumentado por este ácido orgânico, enquanto outros eram completamente inibidos. Sneath et al. (1984) relatam a utilização de citrato como única fonte de carbono por *Bacillus cereus*, porém o isolado testado não foi capaz de fazê-lo.

Segundo Goto (1990), amilases de *Bacillus* spp. tem sido amplamente estudadas do ponto de vista da caracterização,

classificação e regulação genética da produção. Avaliações sobre a capacidade de hidrólise de amido, tween, gelatina e esculina foram positivas para o isolado de *B. cereus* testado. Com relação ao teste de Voges-Proskauer e vermelho de metila, o isolado não foi capaz de produzir acetoína e 2,3- butanediol.

Sneath et al. (1984), relatam que os requerimentos de vitaminas e aminoácidos para o gênero variam consideravelmente com as condições de cultivo do microrganismo. Em testes realizados para a degradação de fenilalanina e tirosina, o isolado não foi capaz de metabolizar estes aminoácidos.

O isolado foi capaz de decompor peróxido de hidrogênio através da produção de catalase, degradar lipídeo (lipase positiva), demonstrou resposta positiva para oxidase, hidrólise do hipurato e urease. Não foi capaz de produzir H₂S e o teste para produção de amônia resultou em uma resposta negativa.

Estudos relacionados a caracterizações morfofisiológicas e bioquímicas de um isolado levam ao entendimento de diversos fatores que regulam a expressão deste microrganismo. Visando a utilização futura em um programa de manejo integrado para o controle de doenças, a manipulação dos diversos fatores relacionados a sua sobrevivência, capacidade de produção de estruturas de resistência e dormência, fisiologia e utilização de substratos, podem levar a obtenção de um produto passível de ser utilizado na produção de culturas de alto valor comercial e qualidade e que possa manter a efetividade de ação deste microrganismo no biocontrole, além de minimizar o uso de agrotóxicos e favorecer a prática de uma agricultura ecologicamente correta.

Tabela 1 - Provas bioquímicas realizadas para caracterização de um isolado de *Bacillus cereus*.

Característica avaliada	<i>Bacillus cereus</i>	Manual de Bergey ¹
Produção de pigmento fluorescente	Negativo	SC
Relação com oxigênio livre	Anaeróbia facultativa	Anaeróbia facultativa
Utilização de fontes de carbono	Positivos ²	SC
Produção de lecitina	Positivo	Positivo
Hidrólise do amido	Positivo	Positivo
Hidrólise de Tween	Positivo	Positivo
Liquefação da gelatina	Positivo	Positivo
Hidrólise de esculina	Positivo	Positivo
Produção de catalase	Positivo	Positivo
Atividade de lipase	Positivo	Positivo
Teste de oxidase	Positivo	Negativo
Hidrólise do hipurato	Positivo	Negativo
Teste de Urease	Positivo	Positivos
Utilização de citrato	Negativo	Positivo
Teste de Voges- Proskauer	Negativo	Positivo
Teste do vermelho de metila	Negativo	Positivo
Degradação de tirosina	Negativo	Positivo
Degradação de fenilalanina	Negativo	Negativo
Produção de H ₂ S	Negativo	SC
Produção de amônia	Negativo	SC

¹ Fonte: adaptado de Sneath et al., 1984

¹Positivo = 11 a 89% dos isolados; Negativo = 90% ou mais dos isolados

SC = sem comparação

²Fontes de carbono utilizadas: α - ciclodextrina, β - ciclodextrina, dextrina, glicogênio, inulina, manana, Tween 40, Tween 80, N- acetil- D- glucosamina, N- acetil- β - D- manosamina, amigdalina, L- arabinose, D- arabitol, D- celobiose, D- frutose, gentiobiose, α - D- glucose, α - D- lactose, lactulose, maltose, maltotriose, D- manose, α - metil- D- galactosídeo, 3- metil- glicose, α - metil- D- glucosídeo, β - metil- D- glucosídeo, α - metil- D- manosídeo, palatinose, D- psicose, D- ribose, sacarose, D- tagatose, D- trealose, turanose, α - ácido hidrobutírico, β - ácido hidrobutírico, ácido α - cetoglutárico, ácido α - cetoalérico, lactamida, ácido- D- láctico metil éster, ácido- L- láctico, ácido- D- málico, ácido- L- málico, ácido piruvático metil éster, ácido propiônico, ácido pirúvico, ácido N- acetil- glutâmico, L- alaninamida, D- alanina, L- alanina, L- alanil- glicina, L- asparagina, ácido- L- glutâmico, ácido- L- glicil- glutâmico, ácido- L- piroglutâmico, L- serina, glicerol, adenosina, 2'- deoxi- adenosina, inosina, timidina, uridina, adenosina- 5'- monofosfato, timidina- 5'- monofosfato, uridina- 5'- monofosfato, D- frutose- 6- fosfato, D- glucose- 6- fosfato, D- L- α - glicerol- fosfato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atlas, R. M., Bartha, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**. Menlo Park, California: Wesley Longman, Inc. 1946. 694 p.

Baker, K. F., Cook, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman. 1974. 433 p.

Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729- 770. 1998.

Biolog. **Biolog Microlog™ System**. User Guide: Hayward: 1999. 111 p.

Blazevic, D. J., Ederer, G. M. **Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology**. New York: John Wiley & Sons. 1975. 136 p.

Brock, T. D. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. 2003. 1019 p.

Caldwell, D. R. **Microbial Physiology and Metabolism**. Madison: Soil Science Society of America. 1999. 404 p.

Campanhola, C., Bettioli, W. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2003. 279 p.

Conn, H. J., Bartholomew, J. W., Jennison, M. W. Staining Methods. In: S. O. A. Bacteriologists (Ed.). **Manual of Microbiological Methods**. New York: McGraw- Hill, 1957, p.10- 41.

Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: CRC Press. 1985. 355 p.

Dye, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* - The "amylovora" group. **New Zealand Journal of Science**, v.11, p.590- 607. 1968.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Finley, N., Fields, M. L. Heat activation and heat- induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Applied Microbiology**, v.10, p.231- 236. 1962.

Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.338- 343. 2002.

Gerhardt, P. E. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. 1994. 791 p.

Goto, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathogens**. San Diego: Academic Press. 1990. 342 p.

Harper, H. A. **Manual de Química Fisiológica**. São Paulo: Atheneu. 1982. 736 p.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969- 976. 1970.

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.44, p.301- 307. 1954.

Kiraly, Z., Klement, A, Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó. 1990. 568 p.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Mariano, R. L. R. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife. 2000. 171 p.

Melo, I. S., Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA- CNPMA, v.1. 1998. 262 p.

Melo, I. S., Valadares-Inglis, M. C., Nass, L. L., Valois, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismos**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA - Meio Ambiente. 2002. 743 p.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, MG: Editora UFLA. 2002. 626 p.

Noël, G. M. A. M., Madrid, E. A., Bottini, R., Lamattina, L. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.815- 823. 2001.

Planas, A. Bacterial 1,3- 1,4- L- glucanases: structure, function and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1543, p.361-382. 2000.

Romeiro, R. S. **Identificação de Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária- UFV. 1976. 91 p.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 279 p.

Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 2001. 373 p.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliares e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopatology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Simmons, J. S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aeorgenes groups and for isolation of certain fungi. **Journal of Infecious Diseases**, v.39, p.201- 214. 1926.

Sneath, P.H.A., 1986. Endospore- forming Gram- positive rods and cocci. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore, Md., pp: 1104- 1139.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, p.969- 987. 1982.

POTENCIAL ANTAGONÍSTICO DE UM ISOLADO DE *Bacillus cereus*
NO CONTROLE DE PATÓGENOS DO TOMATEIRO

RESUMO

Visando complementar a caracterização de um isolado de *Bacillus cereus* bem como uma melhor compreensão dos mecanismos de biocontrole envolvidos na interação rizobactéria- fitopatógenos, testes *in vitro* foram realizados com o intuito de analisar a capacidade de *B. cereus* em produzir compostos antimicrobianos inibitórios ao crescimento de fitopatógenos fúngicos e bacterianos que incitam enfermidades em plantas de tomateiro. Os testes de antibiose direta resultaram em discreta inibição dos patógenos *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas vesicatoria* pelo método de camada dupla, inibição do crescimento micelial de *Alternaria solani*, e ação de compostos voláteis produzidos pelo isolado sobre *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Corynespora cassicola*. O isolado mostrou-se capaz de produzir sideróforos e ácido indol acético, porém foi incapaz de produzir quitinase, β - 1,3 glucanase, pectinase e ácido cianídrico. No que tange a antagonismo *in vitro* o isolado mostrou-se pouco eficiente dentro dos limites de sensibilidade e abrangência dos métodos executados.

ANTAGONISTIC POTENTIAL OF A *Bacillus cereus* ISOLATE IN THE CONTROL OF PATHOGENS OF TOMATO PLANTS

ABSTRACT

Aiming at a complete characterization of an isolate of *Bacillus cereus* as well as a better understanding of the biological control mechanisms involved in the rhizobacteria-phytopathogens interaction, *in vitro* tests were carried out to analyse the ability of *B. cereus* to produce antimicrobial compounds that inhibit the growth of fungal and bacterial phytopathogens that cause diseases in tomato plants. The tests of direct antibiosis resulted in a discrete inhibition of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria* by the double layer method; inhibition of the mycelial growth of *Alternaria solani*, and the action of volatile compounds produced by the isolate upon *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Corynespora cassiicola*. The isolate showed to be able to produce siderophores and indole acetic acid, but was unable to produce chitinase, β - 1,3 glucanase, pectinase and hydrocyanidric acid. In relation to the *in vitro* antagonism, the isolate showed to have little efficiency within the sensitivity and range of the methods carried out.

INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos que interagem com plantas vivem em sua superfície sem lhes causar danos, algumas vezes provendo benefícios às mesmas auxiliando na absorção de nutrientes ou na proteção contra patógenos e pragas.

Bactérias que efetivamente suprimem doenças em plantas vêm sendo intensivamente estudadas nas últimas décadas (Thomashow e Weller 1988; Bettiol, 1991; Melo e Azevedo, 1998; Emmert e Handelsman, 1999; Sabaratnam e Traquiar, 2002; Silva, 2002), e vários mecanismos no combate a patógenos tem sido relatados como a antibiose, a competição por nutrientes e nichos ecológicos e através da indução de resistência sistêmica. Segundo Fravel (1988) e Glick (1995), a síntese de substâncias antimicrobianas é um dos mecanismos mais efetivos que uma rizobactéria pode empregar no combate a fitopatógenos.

Muitas bactérias produtoras de antibióticos têm sido selecionadas para o controle de patógenos, como as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* spp. (Colyer e Mount, 1984, Thomashow e Weller, 1988; Paulitz e Bélanger, 2001), *Streptomyces* spp. (Paulitz e Bélanger, 2001; Moreira e Siqueira, 2002), e *Bacillus* (Milner et al., 1996; Melo e Azevedo, 1998; Emmert e Handelsman, 1999; Paulitz e Bélanger, 2001). São relatadas também como produtoras de toxinas (Brock, 2003), podem agir como larvicidas (Melo e Azevedo, 1998) e liberar compostos metabólicos como o ácido cianídrico, produzido por espécies de *Pseudomonas*, e ativo contra fungos de solo (Glick e Bashan, 1997).

Espécies do gênero *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* e *B. cereus*) atuam no controle biológico de insetos e no controle de diversos patógenos como espécies de *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp. e *Fusarium* spp. (Melo et al., 2002). São também relatadas como produtoras de diversos antibióticos peptídicos, como surfactina, bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina, circulina, micosubtilina e bacilomicina (Landy et al., 1948; Vater, 1986; Brock, 2003; Duffy et al., 2003).

Vários autores relatam a habilidade de *B. cereus* em suprimir tombamento em alfafa causada por *Phytophthora medicaginis* E. M. Hansen e D. P. Maxwell 1991 em ensaios em laboratório, habilidade esta atribuída à capacidade de produção de zwittermicina (Handelsman et al., 1990; Stabb et al., 1994; Handelsman et al., 2000) e kanosamina (Milner et al., 1996).

Diversas enzimas produzidas por rizobactérias podem atuar na lise de células fúngicas. *Pseudomonas stutzeri* (Lehmann e Neumann, 1896) Sijderius, 1946, produtoras de quitinase e laminarase, *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes, 1981) Yabuuchi et al., 1993 agindo através de β -1,3-glucanase, *Erwinia herbicola* (Lohnis, 1911) Dye, 1964 liberando um complexo enzimático quitinolítico e a ação de quitinase por *Serratia marcescens* Bizio 1823 controlam patógenos como *Fusarium solani* (Mart) Sacc. 1881, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* Trow 1901, entre outros (Oliveira et al., 2003).

Outro mecanismo de controle de doenças por rizobactérias é a produção de sideróforos, aumentando a capacidade de sobrevivência e multiplicação do isolado em seu habitat (Kumar e Dube, 1992). Sneath

et al. (1984) relatam que poucas espécies de *Bacillus* excretam tais substâncias, como é o caso de *B. cereus* e *B. subtilis*.

Para uma completa caracterização da rizobactéria em estudo e com o propósito de avaliar se *Bacillus cereus* é capaz de agir no biocontrole direto de fitopatógenos além de sua já relatada capacidade de indução de resistência em plantas de tomateiro (Silva et al., 2004), ensaios *in vitro* foram realizados visando avaliar se o isolado é capaz de produzir compostos antimicrobianos que possam inibir o crescimento de fitopatógenos fúngicos e bacterianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem, cultivo e preservação dos microrganismos

Utilizou-se para a condução dos ensaios um isolado de *Bacillus cereus*, obtido de rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG) e selecionado como indutor de resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro (Silva et al., 2004). Os isolados patogênicos bacterianos *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones, 1901) Bergey et al., 1923, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, 1902, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939 emend. Vauterin et al., 1995, *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge, 1920) Vauterin et al., 1995, e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984 e fúngicos *Sclerotium rolfsii* Sacc. (1911), *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn (1858), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder e H. N. Hansen (1940), *Corynespora cassicola* (Berk & M. A. Curtis) C. T. Wei (1950), *Stemphylium solani* G.F. Weber (1930),

Verticillium dahliae Kleb (1913) e *Alternaria solani* foram obtidos da coleção do laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Bacillus cereus e fitopatógenos bacterianos foram cultivados em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e patógenos fúngicos em meio BDA – batata dextrose ágar - (Tuite, 1969).

Todos os isolados utilizados foram preservados pelas técnicas de solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer - 80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo- a- tubo (Kiralý et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a - 4°C (Williams e Wellington, 1982).

Antibiose direta – Dupla camada

O antagonista foi semeado em pontos na superfície do meio 523 sólido, seguindo-se a incubação a 28°C por 24h. Decorrido este período, as placas foram levadas à câmara de fluxo laminar, invertidas, e clorofórmio vertido na tampa das placas aguardando-se sua volatilização, sob luz UV ligada. Após aproximadamente 1 hora, as placas receberam uma sobrecamada de meio padrão semi-sólido fundente com propágulos de cada patógeno incorporados. A avaliação foi feita através da medição da distância entre a periferia da colônia bacteriana e o limite do halo de inibição, com régua milimétrica (Romeiro, 2001).

Antibiose direta – Estrias

O antagonista foi semeado na superfície de placas de Petri contendo meio 523 sólido pelo método das estrias, seguindo-se a repicagem dos patógenos também por estrias, no sentido perpendicular

as anteriores (Romeiro, 2001). As placas foram então incubadas a 28°C por 24h, quando se fez a avaliação pela observação visual da ocorrência de interrupção da continuidade na formação das estrias dos patógenos.

Inibição do crescimento micelial

Em placas de Petri contendo meio BDA sólido semeou-se o antagonista em pontos equidistantes e, no centro das mesmas, depositou-se um disco de 5mm de diâmetro de micélio do fungo a ser testado. As placas foram incubadas à 26°C até que o fungo na placa controle tivesse tomado toda a placa. Decorrido este período, foi feita avaliação da inibição de crescimento micelial por inspeção visual.

Paralelamente, seguiu-se a mesma metodologia descrita acima, substituindo o meio BDA por meio 523 com o intuito de fornecer as condições ideais ao crescimento bacteriano, confrontando os patógenos fúngicos frente ao antagonista.

Compostos inibitórios voláteis

Cultivou-se o antagonista e patógenos bacterianos em meio 523 líquido a 28°C por 24 horas. Após o tempo de incubação, alíquotas de 100µL da cultura foram incorporadas a 10mL do mesmo meio semi-sólido fundente e este vertido em placas de Petri.

Para patógenos fúngicos, placas de Petri contendo meio BDA foram utilizadas para deposição sobre sua superfície de disco de micélio do patógeno desafiante no centro da placa.

Em câmara de fluxo laminar, retiraram-se as tampas das placas contendo o antagonista e das que continham o patógeno cuja

suscetibilidade a compostos voláteis seria testada. Estas placas foram seladas com parafilme, fundo com fundo, e mantidas sob 28°C para patógenos bacterianos e 25°C para patógenos fúngicos, com todas as combinações possíveis entre antagonistas e desafiantes. As avaliações foram feitas a cada 24 horas, por observação da capacidade de crescimento do desafiante, quando confrontado com o antagonista.

Inibição da germinação de esporos

Bacillus cereus foi cultivado em tubo de ensaio contendo meio 523 sólido por 24 horas a 28°C obtendo-se pela adição de solução salina (0,85%) ao tubo, uma suspensão que foi ajustada em espectrofotômetro ($OD_{540} = 0,5$). Uma alíquota de 500 µl foi depositada em lâmina de microscopia contendo três anéis de parafina fixados por impressão à quente (Halfeld Vieira, 2002). Uma alíquota com o mesmo volume, contendo esporos do fungo previamente crescidos em BDA por 7 dias a 25°C foi misturada à suspensão bacteriana contida na lâmina sendo então incubada. Foram utilizados como controle positivo, solução do fungicida mais comumente utilizado para o patógeno desafiante e, como controle negativo, água.

Para *Phytophthora infestans*, a incubação foi feita em câmara úmida por 2 horas a 18°C e por mais 19 horas em geladeira, antes da avaliação.

A avaliação foi feita pela contagem de esporos germinados ou esporângios germinados e zoósporos liberados, ao microscópio ótico.

Foram feitas três repetições por patógeno, sendo cada repetição representada por uma lâmina de microscopia.

Produção de sideróforos

Para avaliar a capacidade de produção de sideróforos por *Bacillus cereus*, utilizou-se o método de Schwynn e Neilands (1987) com algumas modificações. A bactéria antagonista foi cultivada em Erlenmeyer contendo 10mL de meio TSB (triptic soy broth), incubadas a 28°C por, no mínimo, 48 horas sob agitação constante. Após o período de incubação o meio com crescimento bacteriano foi centrifugado por 10 minutos a 12.000g. Uma alíquota de 1mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se 1mL de solução de CAS (cromo azurol S) com posterior incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. A viragem da coloração do meio de azul para amarelo, indica a produção de sideróforos.

Produção de quitinase

Microrganismos produtores de quitinase, quando cultivados em meio contendo quitina coloidal, produzem um halo claro ao redor de suas colônias.

Meio MLN (meio livre de nitrogênio) complementado com NH_4NO_3 , ágar e adição de quitina coloidal (8g/L) como única fonte de carbono foi utilizado para avaliar a capacidade do antagonista em degradar quitina. Após a repicagem do antagonista em pontos equidistantes de placas de Petri contendo o meio MLN, estas foram colocadas em incubadora a 28°C por até 10 dias e, a cada 24 horas, avaliada a presença de halos ao redor das colônias, sendo então o isolado considerado quitinolítico (Cattelan, 1999).

Produção de β - 1,3- glucanase

Ao meio MLN adicionado de 5g de β - 1,3- glucana como única fonte de C e complementado com NH_4NO_3 e ágar, o isolado foi repicado em pontos, sendo as placas de Petri incubadas a 28°C por 3

dias. Após este período adicionou-se vermelho congo até completa cobertura da superfície do meio contendo o crescimento bacteriano. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 90 minutos, quando o excesso de corante foi dispensado, avaliando-se a formação de zona amarelo-alaranjada ao redor de colônias, o que indica teste positivo para produção de β -1,3-glucanase (Cattelan, 1999).

Produção de pectinase

Partindo de um cultivo em meio 523 líquido, o isolado foi repicado para placas de Petri contendo o meio M9 (Miller, 1974) suplementado com 1,2g de extrato de levedura e 4g/L de pectina. Após incubação por 2 dias a 28°C, colônias surgidas foram retiradas com o auxílio de algodão estéril e, sobre a superfície do meio, adicionada uma solução de HCl 2N até completa cobertura do meio. Após 5 minutos, ocorrendo a formação de halo claro ao redor das colônias, caracteriza-se a produção de pectinase (Cattelan, 1999).

Produção de HCN

Partindo-se da metodologia descrita por Gagné et al. (1991), o isolado foi testado quanto a sua capacidade de produção de ácido cianídrico. Após repicagem em placa contendo 1/10 de TSA suplementado com 4,4g de glicina/L e 0,3mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,081g/L) (Castric, 1975), as placas foram invertidas e, na tampa da placa, depositou-se um disco de papel de filtro impregnado com solução de ácido pícrico a 5% e NaCO_3 a 2%. As placas foram seladas e incubadas por 48 horas a 28°C. A mudança de coloração do papel de amarelo para marrom-alaranjado indica produção de HCN.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria das bactérias que produzem antibióticos contra um amplo espectro de organismos *in vitro* não mantém essa característica quando testadas em casa de vegetação e campo (Schroth e Hancock, 1981; Fravel, 1988), não se mostrando eficientes no biocontrole de fitopatógenos. Portanto, a seleção de agentes de biocontrole não deve utilizar exclusivamente testes em laboratório para decidir sobre a exclusão de microrganismos potencialmente capazes de atuar no controle de doenças de plantas.

Vários fatores podem influenciar a produção de metabólitos secundários por microrganismos *in vitro* como, por exemplo, condições osmóticas, fontes de carbono e nitrogênio, tensão de oxigênio, concentração de minerais no meio (Atlas e Bartha, 1946; Blazevic e Ederer, 1975; Caldwell, 1999; Brock, 2003).

Na antibiose direta pelos métodos da dupla camada e de estrias, o crescimento dos patógenos *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, não foi afetado e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas vesicatoria* tiveram uma discreta inibição no crescimento pelo método de dupla camada sendo, respectivamente de 3,0 e 2,0 cm o halo de inibição ao redor das colônias do antagonista (Figura 1).

Quando se avaliou a atividade de inibição do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Corynespora cassicola*, *Stemphyllium solani*, *Verticillium dahliae* e *Alternaria solani*, somente *A. solani* demonstrou inibição de 1,0 cm ao redor das colônias de *B. cereus* (Figura 2).

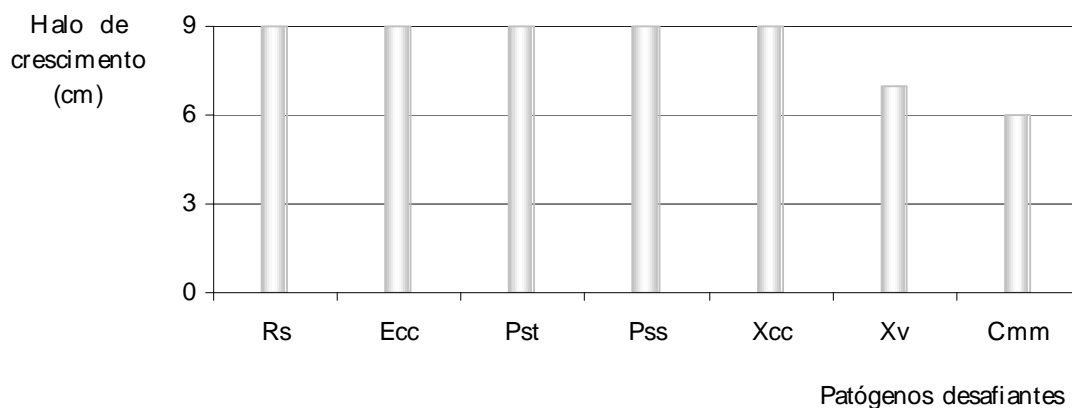


Figura 1. Teste de antibiose *in vitro* para diferentes patógenos bacterianos, quando avaliados pelo método da dupla camada, utilizando-se *Bacillus cereus* como antagonista, em que Rs = *Ralstonia solanacearum*; Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Pst = *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Pss = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; Xcc = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; Xcv = *Xanthomonas vesicatoria* e Cmm = *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

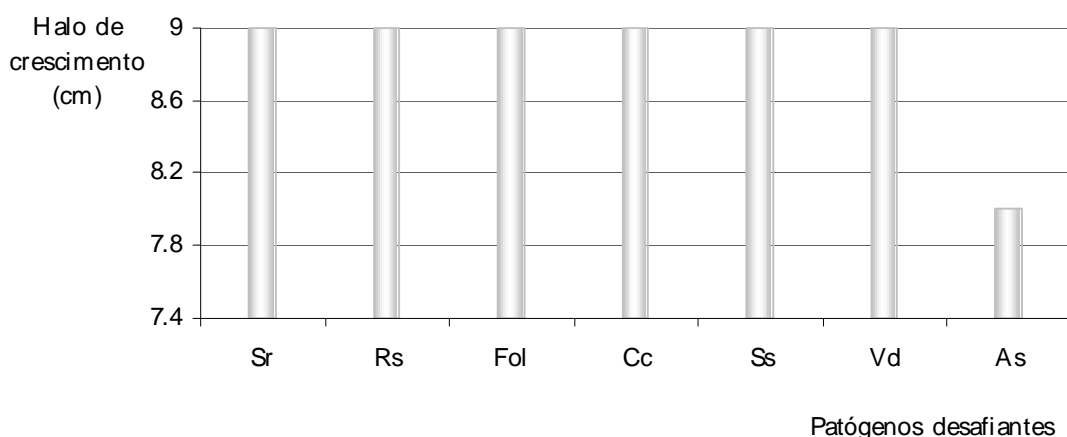


Figura 2. Crescimento micelial de fungos fitopatogênicos em placas de Petri quando submetidos ao teste de antibiose pelo método de estrias, frente a um isolado de *Bacillus cereus*, em que Sr = *Sclerotium rolfsii*; Rs = *Rhizoctonia solani*; Fol = *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; Cc = *Corynespora cassiicola*; Ss = *Stemphylium solani*; Vd = *Verticillium dahliae* e As = *Alternaria solani*.

A inibição de crescimento de patógenos pela produção de compostos voláteis pelo antagonista demonstrou alguma atividade sobre *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Corynespora cassiicola* e *Alternaria solani*, sendo que o diâmetro médio dos halos de crescimento para cada patógeno foi de 2.5, 3.0, 6.3, 3.5 e 4.5 cm, respectivamente, não havendo porém

restrição ao crescimento dos patógenos bacterianos *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas vesicatoria* (Figura 3).

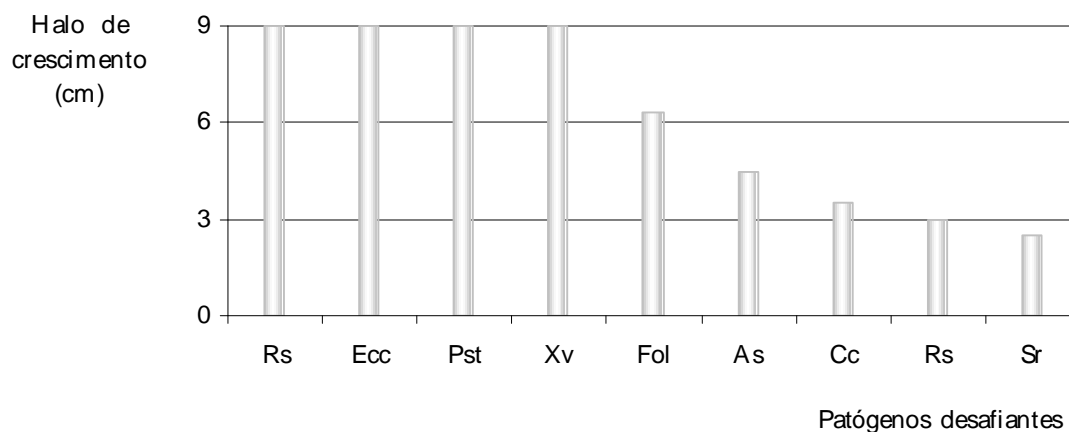


Figura 3. Taxa de crescimento de fitopatógenos submetidos ao teste de antibiose por compostos voláteis produzidos por um isolado de *Bacillus cereus*; em que Rs = *Ralstonia solanacearum*; Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Pst = *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; Xcv = *Xanthomonas vesicatoria*; Fol = *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi*; As = *Alternaria solani*; Cc = *Corynespora cassiicola*; Rs = *Rhizoctonia solani* e Sr = *Sclerotium rolfsii*.

Apesar do isolado de *Bacillus cereus* ser comprovadamente efetivo contra diferentes patógenos em condição de casa de vegetação e campo (Silva, 2002; Silva et al., 2004), mostrou-se pouco eficiente em ensaios *in vitro*, dentro dos limites de sensibilidade e abrangência dos testes de antibiose pelos métodos executados, para diferentes patógenos do tomateiro. Contudo, testes *in vitro* de prospecção de potencialidade antagonística revestem-se de importância como critério auxiliar de seleção, bem como para uma melhor compreensão dos mecanismos de biocontrole envolvidos.

Ensaio conduzidos para avaliar a capacidade da rizobactéria em inibir a germinação de esporos de *Fusarium solani*, *Phytophthora infestans* e *Alternaria solani*, levaram a resultados diferenciados para cada um dos patógenos. Para *P. infestans*, o isolado foi capaz de controlar a germinação de esporângios (Figura 4), ação esta já relatada

para a espécie e relacionada à produção de dois antibióticos (zwittermicina A e kanosamina), além do seqüestro de cálcio, modificação da composição iônica e liberação de amônia no meio (Emmert e Handelsman, 1999). Já para os fungos *F. solani* e *A. solani* o isolado não se mostrou eficiente (Figuras 5 e 6).

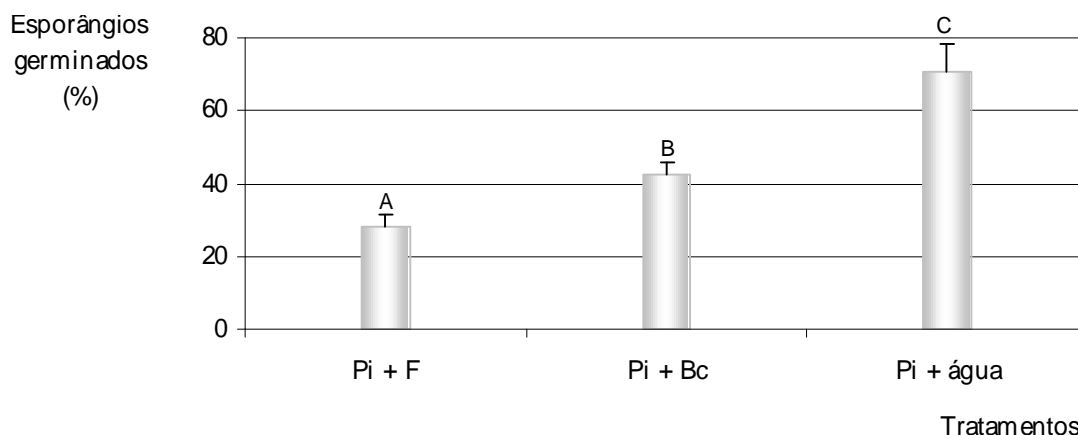


Figura 4. Porcentagem de germinação de esporângios de *Phytophthora infestans* em ensaio *in vitro* quando expostos aos tratamentos com solução de clorotalonil (Pi + F), suspensão de células de *Bacillus cereus* (Pi + Bc) e água (Pi + água).

A capacidade de metabolizar compostos específicos produzidos pelas plantas (como os exsudatos da raiz), transformando-os em compostos inibitórios aos patógenos, mostra-se como um dos principais fatores de influência na capacidade de rizobactérias atuarem no controle biológico (Oliveira et al., 2003), característica considerada premissa básica para a colonização da rizosfera (Kloepper, 1994).

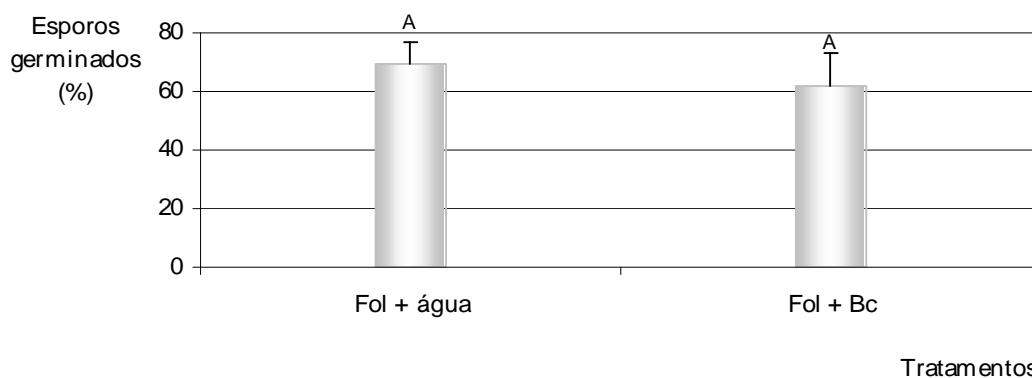


Figura 5. Capacidade de germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* nos tratamentos com água (Fol + água) e em contato com suspensão de células de *Bacillus cereus* (Fol + Bc).

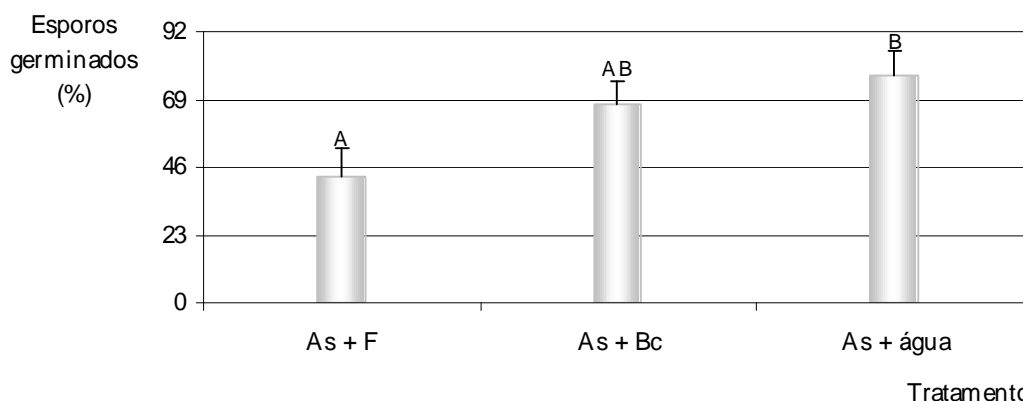


Figura 6. Porcentagem de esporos de *Alternaria solani* capazes de germinar quando expostos à solução de clorotalonil (As + F), suspensão de células de *Bacillus cereus* (As + Bc) e água (As + água).

Várias substâncias produzidas por rizobactérias possuem efeito de controle sobre fitopatógenos destacando-se os sideróforos, os antibióticos, as enzimas e outras moléculas que, apesar de relatos de eficiência de controle serem mais comuns em condições de laboratório ou casa de vegetação (Bashan, 1998; Noël et al., 2001; Ping e Boland, 2004; Ryu et al., 2004), experimentos conduzidos em campo tem demonstrado a efetividade destes organismos no biocontrole (Slininger et al., 1996; Sabaratnam e Traquiar, 2002; Silva et al., 2004).

A produção de sideróforos por rizobactérias pode atuar no antagonismo frente à flora microbiana local, aumentando a capacidade de sobrevivência e multiplicação do isolado em seu habitat (Kumar e Dube, 1992) e podem ser fonte de ferro para plantas, como relatado por Crowley et al. (1988). Segundo Sneath et al. (1984), poucas espécies de *Bacillus* excretam tais substâncias quelantes de ferro, como é o caso de *B. cereus* e *B. subtilis*. O isolado em teste demonstrou ser capaz de produzir substâncias com características de sideróforos.

Espécies de *Bacillus* produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que quebram polímeros complexos como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo sua utilização

como fontes de carbono e doadores de elétrons (Atlas e Bartha, 1946; Brock, 2003). Ensaio realizado para avaliação da capacidade do isolado em degradar quitina, β -1,3 glucana e pectina tiveram resposta negativa.

Relatos envolvendo *Bacillus megaterium* de Bary 1884, *B. subtilis* (Castric, 1982) e *B. pumilus* Meyer e Gottheil, 1901 (Sneath et al., 1984), demonstram que certos isolados deste gênero podem ser cianogênicos, porém *B. cereus* não foi capaz de produzir HCN.

Confrontando-se os resultados obtidos neste trabalho com os realizados anteriormente para o mesmo isolado (Silva, 2004) e considerando-se que um microrganismo indutor de resistência em plantas não pode ter qualquer efeito tóxico sobre o patógeno (Steiner e Schönbeck, 1995), não se pode afirmar que o antagonismo exercido pelo isolado atue no biocontrole em campo.

Se Van Loon et al. (1998) afirmam que mesmo quando não há antagonismo em ensaios *in vitro*, não se pode excluir a possibilidade de ação *in vivo*, pode-se supor que o inverso também ocorra, ou seja, o antagonismo observado *in vitro* pode não atuar em ensaios em casa de vegetação e campo, pois as condições do meio podem afetar a atividade de substâncias antimicrobianas, levando a resultados diferentes em avaliações *in vitro* e *in vivo*.

Estudos para avaliação da capacidade de antagonismo por *Bacillus cereus* em ensaios em casa de vegetação e campo são necessários para comprovar a capacidade do isolado em agir no biocontrole de fitopatógenos e também para elucidar se a antibiose é o mecanismo principal envolvido no biocontrole de fitopatógenos quando *B. cereus* está associada a plantas ou age conjuntamente a

induzir resistência sistêmica, aumentando a capacidade de plantas de tomateiro em resistir ao ataque de patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atlas, R. M., Bartha, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**. Menlo Park, California: Wesley Longman, Inc. 1946. 694 p.

Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729- 770. 1998.

Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA. 1991. 388 p.

Blazevic, D. J., Ederer, G. M. **Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology**. New York: John Wiley & Sons. 1975. 136 p.

Brock, T. D. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. 2003. 1019 p.

Caldwell, D. R. **Microbial Physiology and Metabolism**. Madison: Soil Science Society of America. 1999. 404 p.

Castric, F., Castric, P. A. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.701- 702. 1982.

Castric, P. A. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.21, p.613- 618. 1975.

Cattelan, A. J. **Métodos Quantitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Londrina, PR. 1999. 36 p.

Colyer, P. D., Mount, M. S. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on postharvest soft rot diseases. **Plant Disease**, v.68, p.703- 706. 1984.

Crowley, D. E., Peid, C. P. P., Szannislo, P. J. Utilization of microbial siderophors in iron a acquisition by oat. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.87, p.680- 685. 1988.

Duffy, B., Schouten, A., Raaijmakers, J. M. Pathogen Self-Defense: Mechanisms to Counteract Microbial Antagonism. **Annual Review Phytopathology**, v.41, p.501- 538. 2003.

Emmert, E. A. B., Handelsman, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v.171, p.1- 9. 1999.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Fravel, D. R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p.75- 91, 1988.

Gagné, S., Le Quéré, D., Aliphath, S., Lemay, R. F. Inhibition of plant pathogenic fungi by volatile compounds produced by some PGPR strains (Abstr.). **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.13, p.277. 1991.

Glick, B. R. The enhancement of plant growth by free- living bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.109- 117. 1995.

Glick, B. R., Bashan, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, p.353- 378. 1997.

Halfeld Vieira, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura** (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002. 111 p.

Handelsman J, Brady, S. F., Clardy J, Emmert E. A. B., Milner J. L. Smith, K. P., Stohl, K. P.; Stohl, E. A.; Goodman, R. M. The chemical biology of plant disease supression by *Bacillus cereus*. In: Biology of Plant Microbe Interactions, v.2. de Wilt, P. J. G. M., Bisseling, T., Stiekema, W. J. (eds.) **International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions**. St. Paul, Minnesota, USA. 2000.

Handelsman, J., Raffel, S. J., Mester, E. H, Wunderlich, L. G. C. R. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus*

cereus UW85. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.713- 718. 1990.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969- 976. 1970.

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Kloepper, J. W. Plant growth promoting rhizobacteria: others systems. In: Y. Okon (Ed.). **Azospirillum/Plant Associations**. Boca Raton: CRC Press, p.137- 166. 1994.

Kumar, B. S. D., Dube, H. C. Seed bacterization with a fluorescent pseudomonas for enhanced plant growth, yield and disease control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.539- 542. 1992.

Landy, M., Warren, G. H., Rosenman, S. B., Colio, L. G. Bacillomycin: An antibiotic form *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Proceedings Society Experimental Biology and Medicine**, 539- 541 p., 1948.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Melo, I. S., Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA- CNPMA, v.1. 1998. 262 p.

Melo, I. S., Valadares-Inglis, M. C., Nass, L. L., Valois, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismos**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA - Meio Ambiente. 2002. 743 p.

Miller, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York. 1974. 468 p.

Milner, J. L., Silo-Suh, L., Lee, J. C., He, H.C., Handelsman, J. Production of Kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3061- 3065. 1996.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, MG: Editora UFLA. 2002. 626 p.

Noël, G. M. A. M., Madrid, E. A., Bottini, R., Lamattina, L. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth *in vitro*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.815- 823. 2001.

Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Baldani, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Embrapa Agrobiologia. Seropédica, RJ. Documentos 161, 2003. 40p.

Paulitz, T. C., Bélanger, R. R. Biological Control in Greenhouse Systems. **Annual Review Phytopathology**, v.39, p.103- 133. 2001.

Ping, L., Boland, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **TRENDS in Plant Science**, v.9, n.6. 2004.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 279 p.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Paré, P. W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.134, p.1- 10. 2004.

Sabaratnam, S., Traquiar, J. A. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Tomato Transplants. **Biological Control**, v.23, p.245- 253. 2002.

Schroth, M. N., Hancock, J. G. Selected topics in biological control. **Annual Review Microbiology**, v.35, p.453- 476. 1981.

Schwyn, B., Neilands, J. B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.45- 56. 1987.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliares e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by

Bacillus cereus against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Slininger, P. J. Van Cauwenberge, J. E., Bothast, R. J., Weller, D. M., Thomashow, L. S., Cook, R. J. Effect of growth culture physiological state, metabolites and formulation on the viability, phytotoxicity and efficacy of the take- all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.391- 398. 1996.

Sneath, P.H.A., 1986. Endospore- forming Gram- positive rods and cocci. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore, Md., pp: 1104- 1139.

Stabb, E. V., Jacobson, L. M., Handelsman, J. Zwittermicin A producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.4404- 12. 1994.

Steiner, U., Schönbeck, F. Induced resistance in monocots. In: R. Hammerschmidt, Kuc, J. (Ed.). **Induced Resistance to Disease in Plants**. Dordrech: Kluwer Academic Pub., p.86- 110, 1995.

Thomashow, L. S., Weller, D. M. Role a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal Bacteriology**, v.170, p.3499- 508. 1988.

Tuite, J. **Plant Pathological Methods**. Minneapolis: Burguess Pub. Company. 1969. 239 p.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453- 83. 1998.

Vater, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v.72, p.12- 18. 1986.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, p.969- 987. 1982.

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO TOMATEIRO POR UM ISOLADO
DE *Bacillus cereus*

RESUMO

Um isolado de *Bacillus cereus* isolado de rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro e previamente selecionado como indutor de resistência sistêmica (Silva et al., 2004) foi testado quanto à sua capacidade de promover o crescimento e aumentar a produtividade de plantas de tomateiro, em condições de casa de vegetação e campo, além da capacidade do isolado em produzir substâncias análogas a fitormônios e solubilizar fosfatos, sendo capaz de sintetizar etileno e ácido indol acético e solubilizar fosfato. Ensaio em casa de vegetação consistiram de avaliações dos parâmetros de altura de plantas, contagem do número de folhas e pesos das matérias frescas e secas de plantas, nos intervalos de 30, 60 e 90 dias após o semeio e, ao final de 90 dias de idade avaliaram-se o número de frutos e flores e o peso dos frutos, não se observando atividade promotora de crescimento em plantas microbiolizadas com o isolado. Em campo avaliou-se a produtividade da cultura em experimento montado em Viçosa (MG) e em cultivo protegido em Boa Vista (RO). Em geral, os resultados revelaram que *Bacillus cereus* não age na promoção do crescimento de plantas de tomateiro.

GROWTH PROMOTION OF TOMATO PLANTS BY A *Bacillus cereus* ISOLATE

ABSTRACT

An isolate of *Bacillus cereus* extracted from the rhizosphere of healthy tomato plants previously selected as an inducer of systemic resistance (Silva et al., 2004) was tested to evaluate its ability to promote the growth and productivity of tomato plants under greenhouse and field conditions, as well as its ability to produce substances similar to plant hormones and being able to synthesize ethylene and indole acetic acid and to solubilize phosphate. Essays carried out in greenhouse consisted of evaluations of the parameters height, counting number of leaves and weight of fresh and dry matter of the plants, at the intervals of 30, 60 and 90 days after seedling; and at 90 days of age, the number of fruits and flowers and the weight of fruits were evaluated. Growth promotion activity on the plants grown from microbiolized seeds was not observed. In the field, crop productivity was evaluated in an experiment carried out in Viçosa (MG, Brazil), and in a sheltered cultivation in Boa Vista (RO, Brazil). Generally, the results showed that *Bacillus cereus* does not act in the promotion of growth of tomato plants.

INTRODUÇÃO

Bactérias capazes de colonizar o sistema radicular de plantas promovendo um efeito benéfico são conhecidas como PGPR (Kloepper e Schroth, 1978) e a interação resultante bactéria- planta pode resultar em maior vigor, sanidade e maior produtividade a planta (Chen et al., 1996; Lazarovits e Nowak, 1997; Cattelan e Hartel, 2000). Rizobactérias benéficas têm sido encontradas associadas a raízes de plantas e são mais comuns algumas espécies dos gêneros *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Burr et al., 1978; Chanway, 1992; Glick, 1995).

Há muitas maneiras pelas quais diferentes PGPR tem sido relatadas no estímulo de crescimento das plantas, podendo tais efeitos se relacionar à melhoria de germinação e emergência de sementes, alongamento radicular, melhoria no desempenho de plântulas, dentre outros (Beauchamp, 1993; Sumner, 1990; Glick e Bashan, 1997). Esses efeitos são explicados geralmente pela melhor assimilação de elementos nitrogenados pela planta, aumento do fósforo disponível, produção de fitormônios, e aumento na permeabilidade de raízes (Sumner, 1990; Kloepper, 1994; Glick e Bashan, 1997; Chen et al., 1996; Lazarovits e Nowak, 1997). Indiretamente, podem influenciar o ambiente rizosférico, agindo como competidoras por nichos ecológicos e nutrientes, impedindo ou prevenindo o efeito deletério de organismos fitopatogênicos ou não, além de atuar na indução de resistência sistêmica (Weller, 1988; Wei et al., 1996; Glick, 1995; Beauchamp, 1993; Thomashow e Weller, 1988).

Vários pesquisadores já relataram ter isolado estirpes de *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Pseudomonas* produtoras de

substâncias análogas a fitormônios como auxinas e giberelinas *in vitro* (Burr et al., 1984; Beauchamp, 1993; Yoshikawa et al., 1993).

Segundo Yoshikama et al. (1993), algumas PGPR têm a habilidade de secretar ácidos orgânicos tais como ácidos succínico e láctico e esses podem aumentar o crescimento da planta quando sua concentração na rizosfera é apropriada.

Algumas espécies do gênero *Bacillus* tem sido relatadas como promotoras de crescimento em plantas (Ryu et al., 2004; Egamberdiyeva e Höflich, 2004; Timmusk et al., 1999; Chanway et al., 2000) sendo relatado que rizobactérias podem agir simultaneamente na promoção de crescimento e no biocontrole de doenças (Chen et al., 1996).

Por ser este isolado de *B. cereus* sabidamente indutor de resistência em plantas de tomateiro (Silva et al., 2004), faz-se necessário avaliar se o isolado é capaz de promover o crescimento de plantas de tomateiro de forma direta. Portanto, este trabalho objetivou testar um isolado de *B. cereus* quanto a sua ação como PGPR em plantas de tomateiro, no que tange a promoção de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo e seu cultivo

Utilizou-se para a condução dos ensaios um isolado de *Bacillus cereus*, obtido de rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG) e previamente selecionado como indutor de resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro (Silva, 2002).

Bacillus cereus foi cultivado em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e preservado em solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer - 80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo-a-tubo (Király et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a - 4°C (Williams e Wellington, 1982).

Microbiolização de sementes

Propágulos de *Bacillus cereus* foram usados para microbiolizar sementes de tomateiro, cultivar Santa Clara. Após obtenção de uma suspensão homogênea de células pela adição de água destilada estéril a tubos contendo o isolado tal suspensão foi calibrada em espectrofotômetro para $OD_{540} = 0,5$ e as sementes imersas nesta suspensão por 24 horas sob agitação. O controle consistiu de sementes imersas em água.

Bioensaios *in vitro*

Ácido indol acético - AIA

Para a detecção de AIA utilizou-se o método de Bric et al. (1991) com algumas adaptações. O antagonista foi transferido por

repicagem em pontos equidistantes, para placas de Petri contendo meio TSA (tryptic soy agar) enriquecido com 5mM de L-triptofano (1,021g/L). O meio contido nas placas foi coberto por uma membrana de nitrocelulose e as placas incubadas a 28°C por 24 horas. Após o período de incubação, o meio foi saturado com solução de Salkowski (Gordon e Weber, 1951) e as placas novamente incubadas à temperatura ambiente por até 2 horas, observando-se a formação de halos avermelhados na membrana.

Síntese de etileno

Para avaliar a capacidade do isolado em produzir etileno, utilizou-se o método descrito por Taiz e Zeiger (2004). Em frascos tipo penicilina contendo meio 523 sólido o antagonista foi repicado fazendo-se uma estria sobre o meio com a alça de platina reta e posterior fechamento hermético dos frascos. Após incubação a 28°C por 24 horas, uma alíquota de 1 mL do ar contido dentro dos frascos foi injetada em cromatógrafo de fase gasosa, para a avaliação do teor de etileno contido na amostra.

Bioensaios *in vivo*

A avaliação do teor de etileno em plantas de tomateiro foi realizada após cultivo de plantas por 40 dias em mistura estéril 3:1:1 de solo, areia e esterco, utilizando-se um cromatógrafo de fase gasosa.

Após o cultivo das plantas por 40 dias em casa de vegetação, discos de folhas de tomateiro foram retirados e transferidos para frascos tipo penicilina, que foram lacrados e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos e 1 hora para volatilização do hormônio. Após

os períodos de incubação, uma alíquota de 1 mL do ar contido nos frascos foi injetada em cromatógrafo de fase gasosa para avaliar se plantas advindas de sementes tratadas com a rizobactéria teriam seu teor de etileno aumentado, em relação ao tratamento controle.

Solubilização de fosfato

Utilizou-se a metodologia de Sylvester-Bradley et al. (Castric e Castric, 1982) com algumas modificações. Partindo-se de cultivo bacteriano com 24 horas de crescimento, repicou-se o isolado para placas de Petri contendo meio de cultivo acrescido de CaHPO_4 , sendo estas incubadas a 28°C por, até, 7 dias. A avaliação das placas consistiu da observação, a cada 24 horas, do aparecimento de um halo claro ao redor das colônias, característico da solubilização de fosfato.

Bioensaio de promoção de crescimento

Para a avaliação de promoção de crescimento foram utilizadas plantas de tomateiro advindas de sementes microbiolizadas e cultivadas em casa de vegetação por até 90 dias, em vasos plásticos contendo mistura estéril 3:1:1 de solo, areia e esterco.

Plantas de tomateiro com 30 dias de idade, cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato PlantMax série prata foram utilizadas para a realização do ensaio de campo, conduzido no Sítio Criciúma, município de Viçosa (MG) e sob cultivo protegido, na Embrapa Roraima (CNPAP), num período de 90 dias (setembro a novembro de 2003) após o transplante, avaliando-se a produtividade final da cultura considerando parâmetros de peso e número de frutos ao final do ciclo.

Em Boa Vista, o ensaio foi montado sob a forma de 2 fileiras simples, sendo 1 fila de plantas microbiolizadas e 1 fila do tratamento controle, contendo 20 plantas cada fileira.

Os dados foram analisados utilizando-se o teste t a 5% de significância.

Em Viçosa o ensaio foi montado no delineamento experimental de blocos casualizados, com 4 blocos e 4 plantas por repetição, sendo os blocos constituídos de 5 diferentes tratamentos (Quadro 1) e os resultados analisados pelo teste Tukey a 5% de significância.

As avaliações em casa de vegetação consistiram de medições da altura de plantas, contagem do número de folhas e pesos das matérias fresca e seca de plantas, em três intervalos distintos, a saber: 30, 60 e 90 dias após o semeio. Ao final de 90 dias de idade também foram avaliados o número de frutos e flores e o peso dos frutos, sendo os dados analisados aplicando-se o teste t a 5%.

Quadro 1 - Tratamentos empregados no experimento de promoção de crescimento em plantas de tomateiro por um isolado de *Bacillus cereus*.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
Tratamento M	Microbiolização de sementes com <i>Bacillus cereus</i>
Tratamento P	Pulverização de <i>B. cereus</i> em tomateiro no campo, a cada 7 dias
Tratamento MP	Microbiolização e pulverização de <i>B. cereus</i> em tomateiro
Tratamento T	Microbiolização de sementes com água
Tratamento F	Pulverização com Chlorotalonil a 2g/L i. a. no campo, a cada 7 dias

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado em estudo demonstrou a capacidade de produzir etileno tanto em avaliações *in vivo* quanto *in vitro* (Figuras 1 e 2) e auxina que, em determinadas concentrações podem afetar de forma negativa a resposta de plantas ao crescimento. Estes dois fitormônios provocam respostas semelhantes na planta, como por exemplo, a inibição do alongamento de caules (Taiz e Zeiger, 2004).

Como o isolado mostrou-se produtor de etileno e auxina além de saber-se a auxina uma promotora da síntese de etileno, pode-se supor que os níveis deste hormônio estejam elevados em plantas advindas do tratamento com *Bacillus cereus*, levando-se a hipotetizar possíveis efeitos deletérios ao desenvolvimento da planta. Observações do sistema radicular de plantas de tomateiro, quando cultivadas em casa de vegetação, mostravam raízes com menor comprimento e aumento no número de pêlos radiculares, característico da ação de etileno em plantas (dados não mostrados).

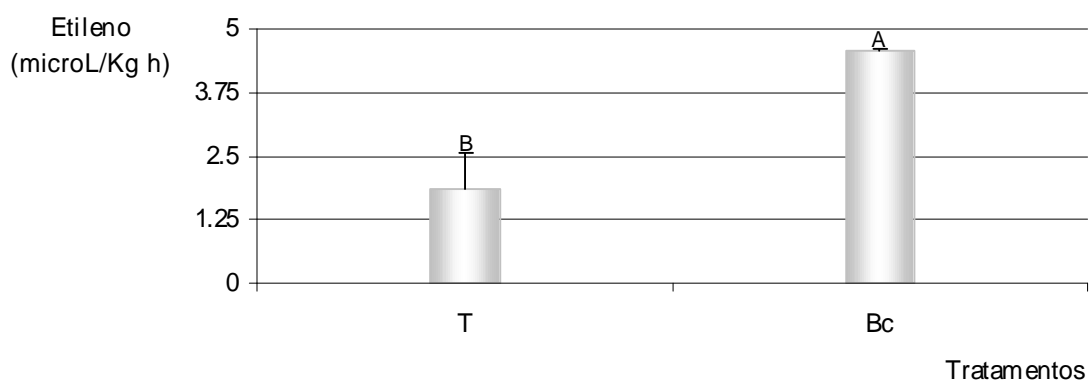


Figura 1. Avaliação da concentração de etileno em folhas de tomateiro advindas de sementes microbiolizadas com suspensão de *Bacillus cereus* (Bc) quando comparadas ao controle (T) após o cultivo em casa de vegetação por 40 dias.

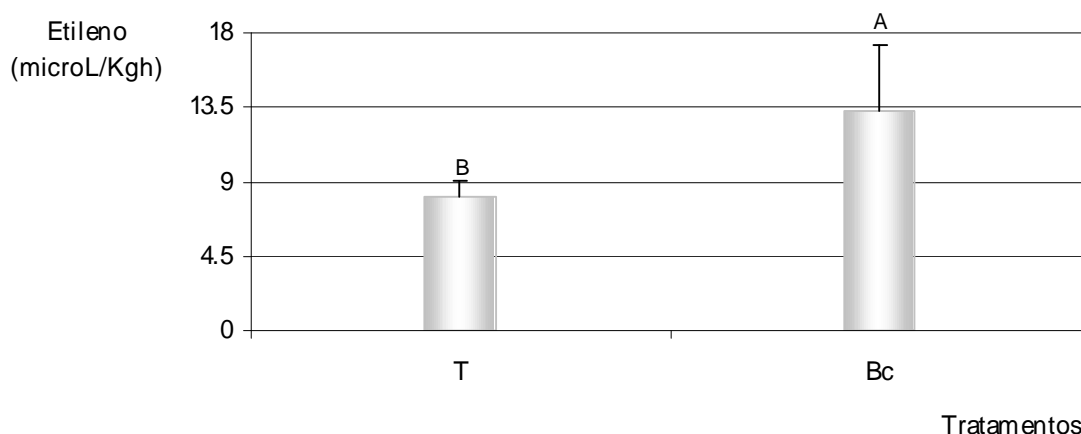


Figura 2. Avaliação da concentração de etileno em frascos penicilina contendo *Bacillus cereus* (Bc) crescido em meio padrão por 24 horas, quando comparado ao controle (T).

Por outro lado, a síntese de etileno está também relacionada a microrganismos indutores de resistência sistêmica (Ping e Boland, 2004; Ryu et al., 2004) ativando diversos genes de defesa na planta quando aliado ao ácido jasmônico (Taiz e Zeiger, 2004; Ping e Boland, 2004).

Vários microrganismos têm a capacidade de produzir substâncias tipo hormônios (Tien et al., 1979; Hadas e Okon, 1987). O aumento dos níveis de etileno é relatado em plantas expostas a *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani e Chalmers, 1919 (Taiz e Zeiger, 2004), *Pseudomonas putida* (Trevisan, 1889) Migula, 1895 (Oliveira et al., 2003), *Bacillus* sp. (Ryu et al., 2004; Ping e Boland, 2004), inclusive relacionando esta atividade como característica de microrganismos indutores de resistência sistêmica, através da ativação de mecanismos pré-existentes em plantas. Segundo Sneath et al. (1984) poucas espécies de *Bacillus* são capazes de aumentar o nível de etileno em plantas, o que pode ser verificado por este isolado de *Bacillus cereus*, que foi também capaz de produzir ácido indol acético, em ensaios realizados *in vitro*, concordando com relatos na literatura (Nöel et al., 2001; Lindow et al., 1998). Hormônios desta natureza estão

intimamente relacionados na alongação e diferenciação celular, emissão de raízes, florescimento e amadurecimento de frutos, podendo estimular o crescimento de plantas (Buchenauer, 1998; Cattelan e Hartel, 2000; Gutierrez-Mañero et al., 2001; Lazarovits e Nowak, 1997).

Lazarovitz e Nowak (1997) sugerem que uma PGPR não pode, sem estar associada a uma planta, produzir qualquer fitormônio. Porém Selvadurai et al. (1991) relataram a síntese de indol-3-etanol por *Bacillus cereus*, substância esta que serve como uma forma de estoque de AIA, podendo ser convertida a fitormônio ativo.

A capacidade de rizobactérias em influenciar a disponibilidade de fostato por secretar fosfatases para a mineralização de fósforo orgânico, ou pela liberação de ácidos orgânicos para a solubilização de fosfatos inorgânicos tem sido relatada (Rodríguez e Fraga, 1999, Lazarovits e Nowak, 1997), incluindo-se os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* como principais, e outras como *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (Oliveira et al., 2003), capacidade esta demonstrada pelo isolado *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus demonstrou em ensaios anteriores ser capaz de induzir resistência frente a diferentes patógenos que incitam enfermidades em tomateiro e também foi capaz de aumentar a produtividade da cultura em condições de campo, aliando-se a microbiolização de sementes a tratamento químico ou não, quando comparado aos controles (Silva et al., 2004). No ensaio de campo realizado em Viçosa, observou-se uma variação considerável entre os tratamentos no que diz respeito à forma de veiculação da rizobactéria, porém estes não diferem estatisticamente entre si. Pode-se verificar

um incremento na produção de frutos sadios (Figuras 3, 4, 5) quando o isolado foi utilizado para microbiolização e posterior pulverização aérea, em relação aos tratamentos de microbiolização ou pulverização sozinhos.

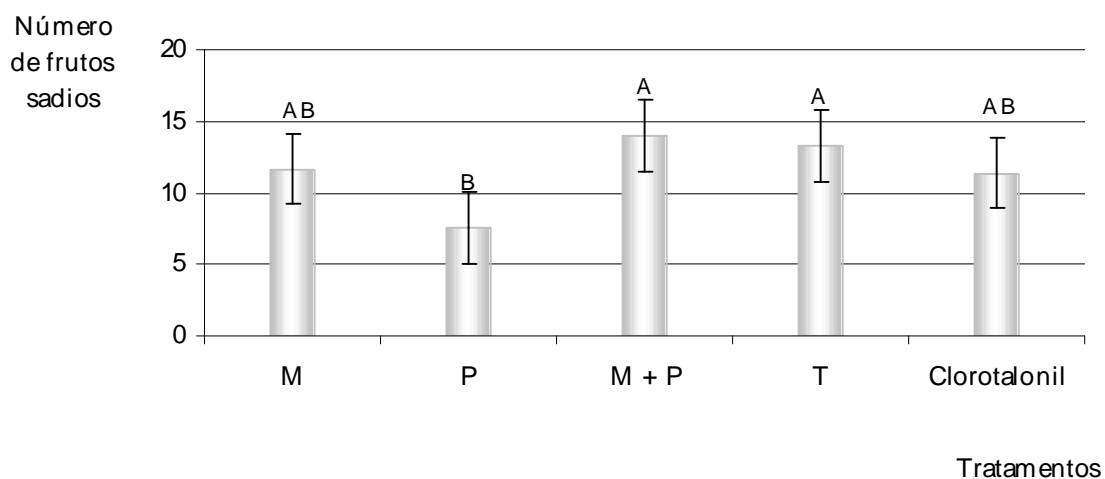


Figura 3 – Número médio de frutos de tomateiro sob cultivo em campo (Viçosa – MG), aos 120 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

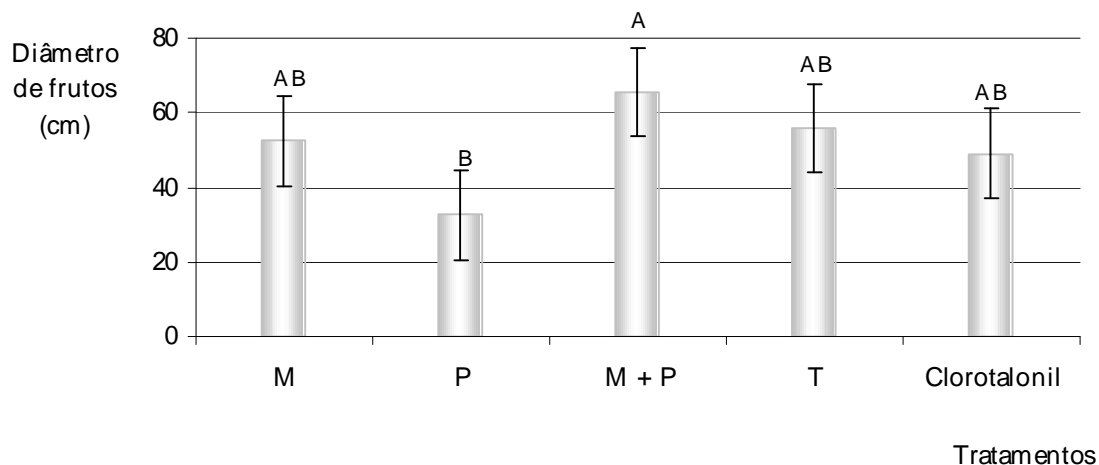


Figura 4. Diâmetro médio de frutos de tomateiro sob cultivo em campo (Viçosa – MG), aos 120 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Algumas hipóteses podem ser levantadas na tentativa de se explicar este comportamento, como a competição na parte aérea das plantas por espaço e nutrientes entre *B. cereus* e outros microrganismos, inclusive fitopatógenos, aliados a já sabida

capacidade deste isolado em induzir resistência sistêmica em tomateiro.

Em ensaio realizado em Boa Vista (RO), o peso de frutos diferiu do controle (Figura 6), demonstrando um aumento significativo na produtividade da cultura. A diferença de resposta entre a produtividade em Viçosa e a de Boa Vista pode se relacionar à montagem do experimento. Em Boa Vista (RO) o experimento foi realizado sob cultivo protegido, utilizando-se de irrigação por gotejamento, que favorece um microclima mais apto ao desenvolvimento bacteriano.

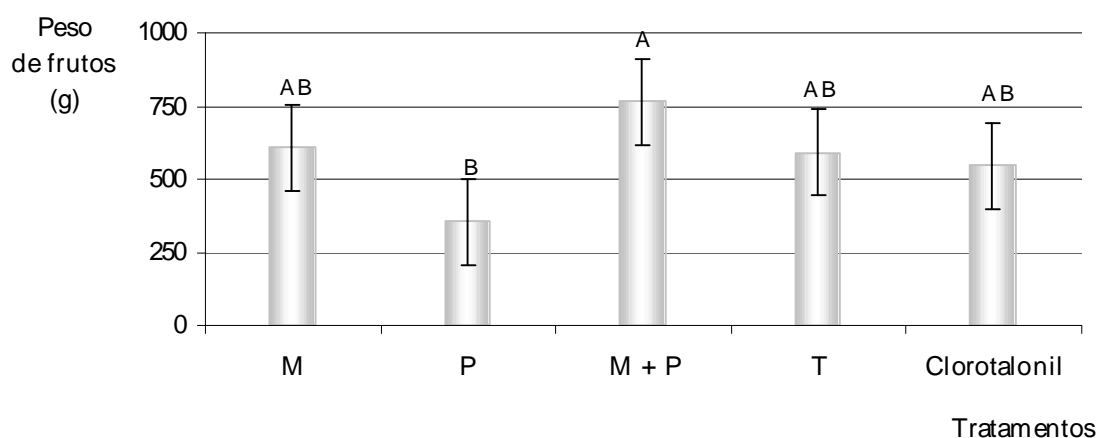


Figura 5. Peso médio de frutos de tomateiro sob cultivo em campo (Viçosa - MG), aos 120 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

O solo arenoso na área utilizada para a montagem do experimento em Boa Vista (RO) pode ter influenciado a colonização radicular pela rizobactéria pois, segundo Moreira e Siqueira (2002), o status físico-químico influencia o microambiente e, conseqüentemente, o comportamento de populações microbianas.

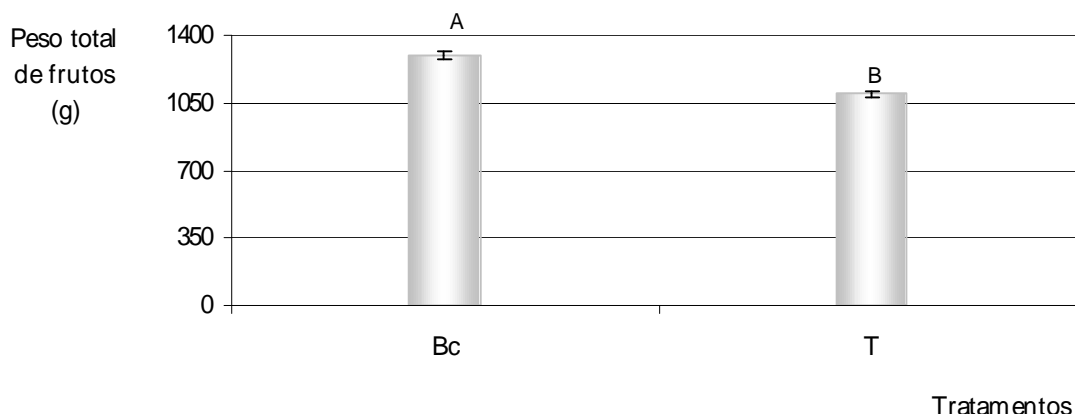


Figura 6. Peso total de frutos de tomateiro sob cultivo em campo (Boa Vista - RO), aos 120 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Em casa de vegetação, a rizobactéria não foi capaz de promover o crescimento de plantas, em conformidade com avaliações feitas por Silva (2002) para o mesmo isolado. Plantas advindas de sementes tratadas com *Bacillus cereus* não diferiram estatisticamente do controle não se verificando incremento nos parâmetros analisados (Figuras 7 a 14) a exceção da altura de plantas aos 90 dias.

Em geral os resultados demonstraram que a rizobactéria não age na promoção de crescimento de plantas de tomateiro, porém verifica-se um potencial para favorecer o aumento da produtividade na cultura. Faz-se necessária uma avaliação mais criteriosa em relação à forma de liberação da rizobactéria no campo possibilitando um microambiente que favoreça a atuação do microrganismo, além de estudos de formulações que possibilitem uma melhoria na performance do mesmo, levando a um equilíbrio de todo o sistema, possibilitando assim a máxima expressão do potencial deste isolado de *B. cereus* como indutor de resistência, o que levará a uma maior produtividade na cultura.

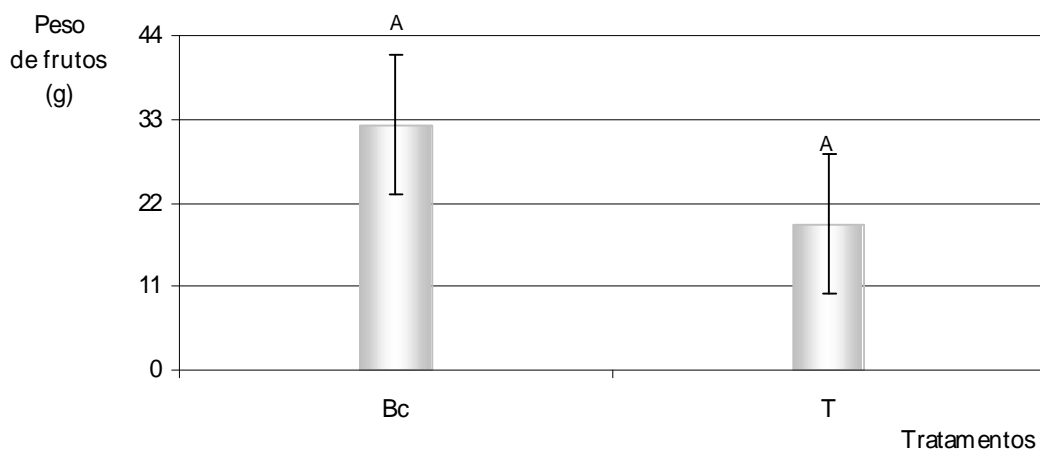


Figura 7. Peso médio de frutos de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

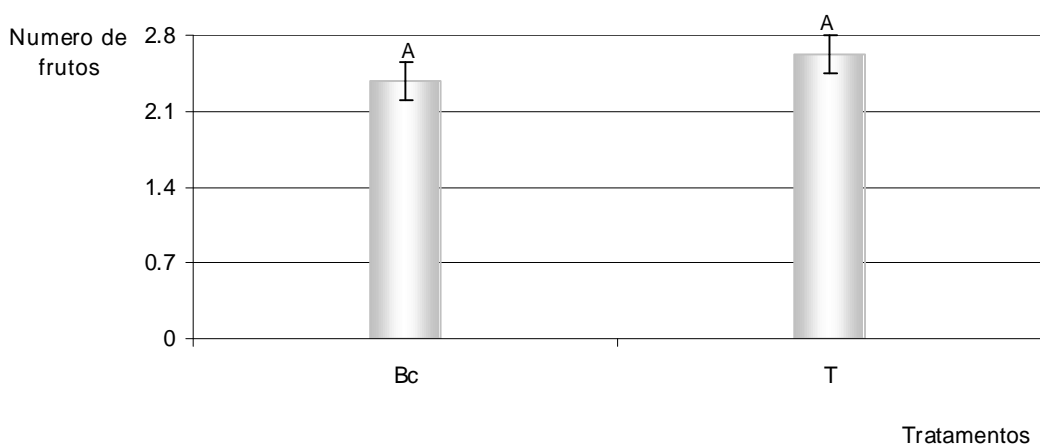


Figura 8. Número médio de frutos de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

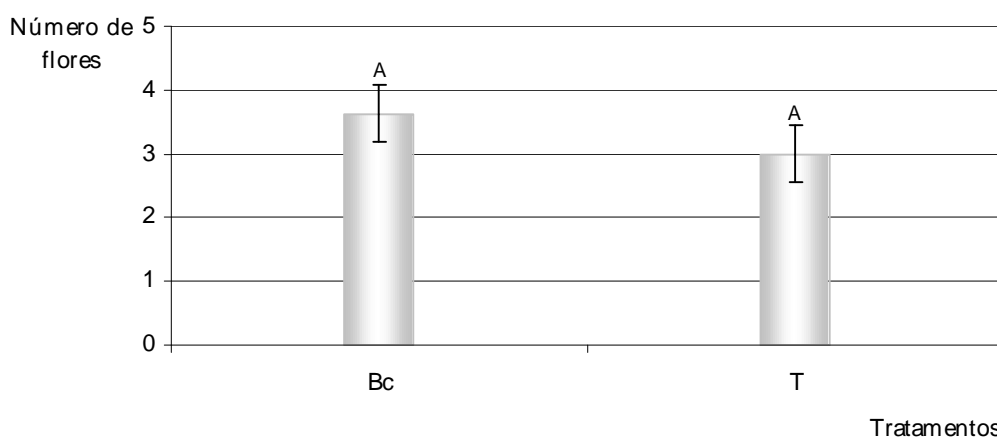


Figura 9. Número médio de flores em plantas de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

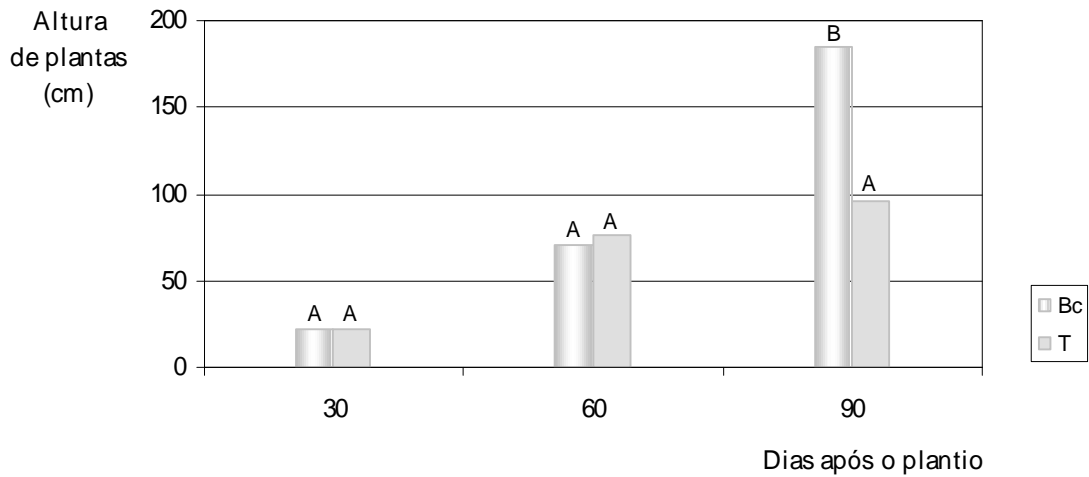


Figura 10. Altura de plantas de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

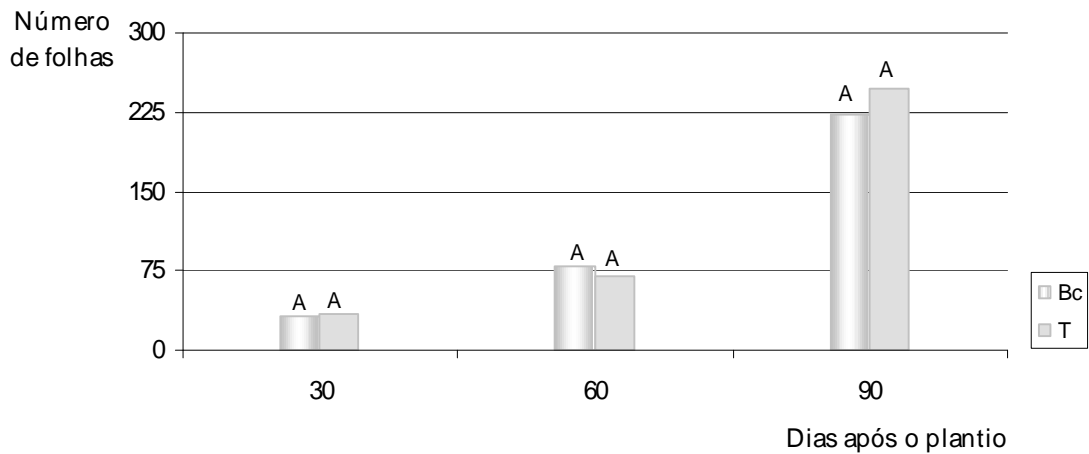


Figura 11. Número de folhas em plantas de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

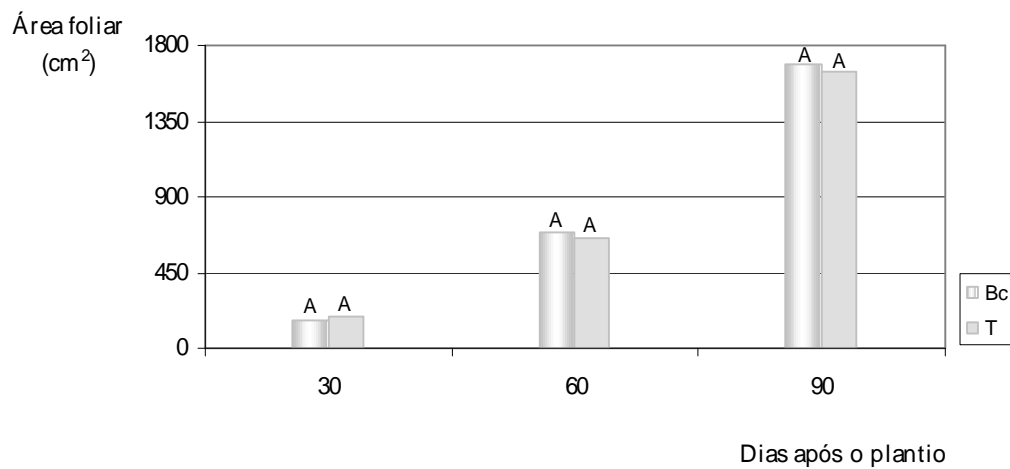


Figura 12. Área foliar de plantas de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

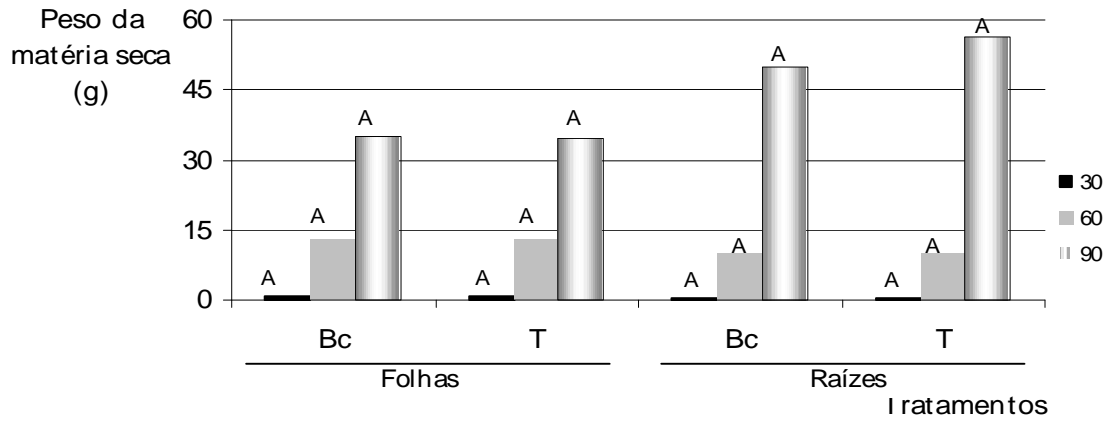


Figura 13. Peso da matéria seca de folhas e raízes de plantas de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

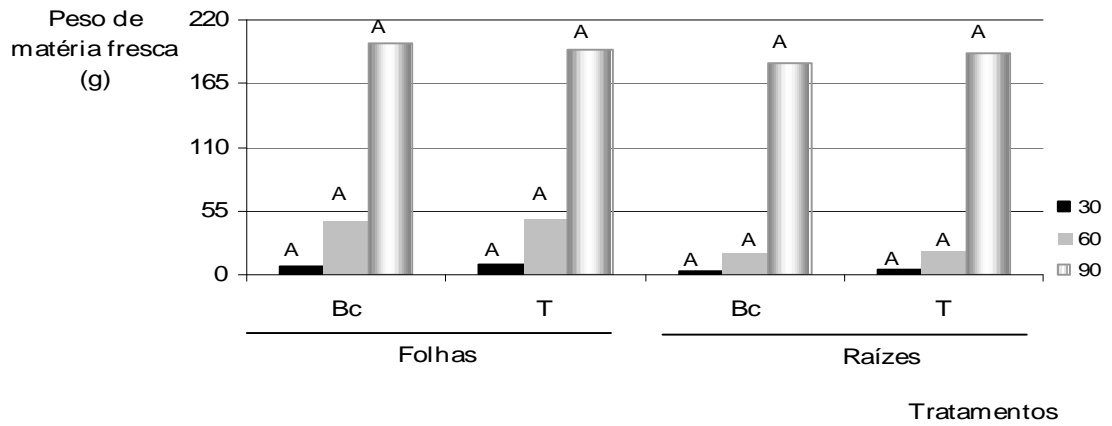


Figura 14. Peso da matéria fresca de folhas e raízes de plantas de tomateiro sob cultivo em casa de vegetação, aos 90 dias de idade. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t a 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beauchamp, C. J. Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. **Phytoprotection**, v.74, p.19- 27. 1993.

Bric, J. M., Bostock, R. M., Silverstone, S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology** v.57, p.535- 538, 1991.

Buchenauer, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329- 348. 1998.

Burr, T. J., Caesar, A. Beneficial Plant Bacteria. **Critical Review in Plant Science**, v.2, p.1- 20. 1984.

Burr, T. J., Schroth, M. N., Suslow, T. Increased potato yield by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v.68, n.9, p.1377- 1383. 1978.

Castric, F., Castric, P. A. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.701- 702. 1982.

Cattelan, A. J., Hartel, P.G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG. 2000, p.213- 234.

Chanway, C. P. Influence of soil biota on Douglas-fir *Pseudotsuga Menziessi* seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.1025- 1031. 1992.

Chanway, C. P., Shishido, M., Nairn, J. Jungwirth, S., Markham, J., Xiao, G., Holl, F. B. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81- 88. 2000.

Chen, Y., Mei, R., Lu, S. Liu, L.; Kloepper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in

chinese agriculture. In: R. S. G. Utkhede, V.K. (Ed.). **Management of Soil Borne Diseases**. New Delhi: Kalyani Publishers, 1996, p.165- 184.

Egamberdiyeva, D., Höflich, G. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. **Journal of Arid Environments**, v.56, p.293-301. 2004.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Glick, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.109- 117. 1995.

Glick, B. R., Bashan, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, p.353- 378. 1997.

Gordon, S. A., Weber, R. P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192- 195. 1951.

Gutierrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206- 211. 2001.

Hadas, R., Okon, Y. Effect of *Azospirillum brasiliense* inoculation of root morphology and respiration in tomato seedlings. **Biology and Fertility of Soils**, v.5, p.241- 247. 1987.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969- 976. 1970.

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.44, p.301- 307. 1954.

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Kloepper, J. W. Plant growth promoting rhizobacteria: others systems. In: Y. Okon (Ed.). **Azospirillum/Plant Associations**. Boca Raton: CRC Press, p.137- 166, 1994.

Kloepper, J. W., Schroth, M. N. "In promoting rhizobacteria on radishes". Proc. 4th Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers, p.879- 882, 1978.

Lazarovits, G., Nowak, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Hort Science**, v.32, n.2, p.188- 192. 1997.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Lindow, S. E., Desurmont, C., Elkins, R., McGourty, G., Clark, E., Brandl, M. T. Occurrence of indole-3-acetic acid producing bacteria on pear trees and their association with frit russet. **Phytopathology**, v.88, p.1149- 1157. 1998.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, MG: Editora UFLA. 2002. 626 p.

Noël, G. M. A. M., Madrid, E. A., Bottini, R., Lamattina, L. Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.815- 823. 2001.

Oliveira, A. L. M., Urquiaga, S., Baldani, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Documentos 161, 2003. 40 p.

Ping, L., Boland, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **TRENDS in Plant Science**, v.9, n.6. 2004.

Rodriguez, H., Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319- 339. 1999.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 279 p.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Paré, P. W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.134, p.1- 10. 2004.

Selvadurai, E. L., Brown, A. E., Hamilton, J. T. G. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.401- 403. 1991.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliares e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. (Doutorado).

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Sneath, P.H.A., 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore, Md., pp: 1104- 1139.

Sumner, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Science**, v.12, p.53- 123. 1990.

Taiz, L., Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 2004. 720 p.

Thomashow, L. S., Weller, D. M. Role a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal Bacteriology**, v.170, p.3499- 508. 1988.

Tien, T. M., Gaskins, M. H., Hubbell, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016- 1024. 1979.

Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U., Tillberg, E. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.1847- 1852. 1999.

Wei, G., Kloepper, J. W., Tunzun, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, p.221- 224, 1996

Weller, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p.379- 407. 1988.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, p.969- 987. 1982.

Yoshikawa, M., Irai, N., Wakabayashi, K. et al. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, n.12, p.1150- 1154. 1993.

AVALIAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA DE UMA FORMULAÇÃO
PROPOSTA PARA UM ISOLADO DE *Bacillus cereus*, SELECIONADO
COMO AGENTE DE BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES DO
TOMATEIRO

RESUMO

Com vistas à obtenção de uma formulação capaz de manter a efetividade de ação de um isolado de *Bacillus cereus*, avaliou-se o potencial de uma formulação proposta (Garcia, 2004) contendo solução de Hoagland como fonte de micronutrientes (substrato de crescimento), extrato aquoso de propágulos de *Saccharomyces cerevisiae* (indutor de resistência), goma xantana (espessante, indutor de resistência), Tween 80 (adjuvante de estabelecimento), sacarose como fonte de carbono (substrato de crescimento) e água (veículo), utilizando-se como secantes fubá, celulose ou sílica texturizada. Pôde-se observar que, dos três secantes avaliados, a sobrevivência de células foi maior quando se utilizou fubá como secante. Sílica texturizada e celulose comportaram-se, pela ordem, menos favoráveis a manutenção da viabilidade de células do isolado. Porém, nenhum dos tratamentos foi eficiente em aumentar a sobrevivência do isolado, quando comparados aos controles.

EVALUATION OF THE SHELF LIFE OF A FORMULATION PROPOSED
FOR A *Bacillus cereus* ISOLATE SELECTED AS AN AGENT OF
BIOLOGICAL CONTROL OF TOMATO PLANT DISEASES

ABSTRACT

Aiming at the obtention of a formulation able to keep the effectivity of action of an isolate of *Bacillus cereus*, the potential of a proposed formulation (Garcia, 2004) was evaluated, containing Hoagland solution as source of micro nutrients (growth substrate), aqueous extract of propagules of *Saccharomyces cerevisiae* (inducer of resistance), xanthane gum (thickener, inducer of resistance), Tween 80 (establishment adjuvant), sucrose as source of carbon (growth substrate) and water (carrier), using as dryers maize flour, cellulose or texturized silica. From the three dryers evaluated, it was observed that the survival of the cells was greater when maize flour was used as dryer. Texturized silica and cellulose, in this order, were less favorable to the viability maintenance of the cells of the isolate. But neither treatments were efficient to increase the survival of the isolate, when compared to the controls.

INTRODUÇÃO

No atual contexto mundial, onde a competitividade industrial é crescente, a aplicação de princípios, métodos, instrumentos ou processos elaborados a partir da pesquisa científica para desenvolver e aperfeiçoar produtos é essencial para qualquer país.

A partir da década de 60, a utilização de agrotóxicos no Brasil aliado a um conjunto de tecnologias, impulsionou o setor agrícola. Atualmente os gastos com pesticidas movimentam por ano no mercado mundial, valores superiores a US\$ 30 bilhões, sendo o Brasil o quinto maior consumidor de agrotóxicos do mundo, com 250 ingredientes ativos registrados para uso no país (Moreira e Siqueira, 2002). Contudo, problemas advindos do impacto destes produtos no ambiente, os riscos à saúde humana e o desenvolvimento de resistência nos microrganismos pela sua utilização continuada, além dos gastos financeiros, reforçam a busca por alternativas menos poluentes para o controle de fitomoléstias.

Embora seja possível a utilização de formulações biológicas no controle de doenças de plantas, as metas de produção, formulação e liberação de agentes microbianos no ambiente demandam estudos e validações para sua correta implementação em larga escala. O estudo de risco ambiental, a confiabilidade e conhecimento pelo agricultor, a relação custo-benefício para a produção, uma melhor compreensão do significado e modo de ação das espécies antagônicas, os fatores que influenciam sua atuação nas várias interações (antagonista-planta; antagonista-patógeno; antagonista-organismos não alvo) e o desenvolvimento de tecnologias de veiculação destes organismos são pontos importantes no desenvolvimento de um biopesticida.

A utilização de bactérias como organismos benéficos no desenvolvimento de plantas já é bastante conhecido, através do uso de

inoculantes para leguminosas (Atlas e Bartha, 1946; Brock, 2003; Valarini, 1998), na promoção do crescimento (Bashan, 1998; Cattelan e Hartel, 2000; Chen et al., 1996; Gutierrez-Mañero et al., 2001) e indução de resistência em plantas (Cavalcanti et al., 2004; Silva et al., 2004).

Desde o primeiro relato da utilização de microrganismos com vistas à melhoria no estado nutricional da planta (Nobbe, 1896) até os dias atuais, o controle biológico tem evoluído muito, encontrando-se na literatura vários relatos de formulações veiculando diferentes gêneros de microrganismos sendo testadas com relativo sucesso.

Um grande número de tipos de formulação, incluindo pó, grânulos, pó molhável e líquidos tem sido usados para proteção de plantas (Stirling, 1991). Tem-se também considerado o uso de encapsulação de agentes de controle biológico em alginato de sódio (Fravel et al., 1985).

É sabido que muitos materiais poliméricos são utilizados para desenvolver projetos de liberação controlada de drogas, devido sua versatilidade que permite combinar várias propriedades (Andreopoulos e Tarantili, 2001). A celulose modificada é um destes materiais, assim como a goma xantana, um típico representante da classe de biopolímeros, um polissacarídeo extracelular de alto peso molecular produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Soluções com goma xantana mostram muita estabilidade sob altas variações de temperatura e pH e na presença de vários tipos e quantidades de sais (Kang e Pettit, 1993). Outros materiais tem sido pesquisados como carreadores, como por exemplo, turfa, vermiculita, lignita, caolinita, CaCO_3 , carboximetilcelulose e outros (Moënne-Loccoz et al., 1998; Suslow e Schroth, 1982).

A vida de prateleira é uma característica crucial para a viabilidade de uma formulação. Segundo Bashan (1998) e Medugno (1995) uma formulação com vida de prateleira inferior a 18 meses é crítica para a industrialização.

As características de formulações utilizadas para liberação de inoculantes bacterianos podem influenciar sua performance na rizosfera (Trevors et al., 1992; Vidhyasekaran, 1995; Russo et al., 1996) e sua eficácia está intimamente relacionada à manutenção de sua população. Uma correta formulação pode promover efetivo controle de doenças, resultando em rendimentos similares e até superiores aos obtidos quando se utiliza o controle químico (Vidhyasekaran, 1995; Moënne- Loccoz et al., 1998).

Para ser efetivo como um produto comercial, formulações de microrganismos devem ter uma meia-vida média que justifique sua formulação, fazendo com que esta possa ser armazenada em ambientes diversos. Os produtos mais aceitos são aqueles produzidos a partir de bactérias formadoras de endósporos e fungos que produzem clamidósporos e oósporos de parede espessa (Stirling, 1991). Membros do gênero *Bacillus* formam endósporos resistentes sob condições de estresse, incluindo altas temperaturas, baixa umidade e limitação de nutrientes.

Com base nas considerações expostas acima, este ensaio objetivou avaliar a capacidade de manutenção da viabilidade celular de um isolado de *Bacillus cereus*, agente de indução de resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro (Silva et al., 2004), veiculado por uma formulação proposta (Garcia, 2004), com vistas à obtenção de um produto passível de ser utilizado na cultura do tomateiro e que possa manter a efetividade de ação deste microrganismo no controle de doenças das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e seu cultivo

Utilizou-se para a condução dos ensaios um isolado de *Bacillus cereus*, obtido de rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG) e selecionado como indutor de resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro (Silva, 2002).

Bacillus cereus foi cultivado em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e preservado em solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer - 80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo-a-tubo (Kiryal et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a - 4°C (Williams e Wellington, 1982).

Teste de uma formulação quanto à vida de prateleira

Utilizou-se para o preparo da formulação os seguintes constituintes: solução de Hoagland como fonte de micronutrientes (substrato de crescimento), extrato aquoso de propágulos de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen 1883 (indutor de resistência), goma xantana (espessante, indutor de resistência), Tween 80 (adjuvante de estabelecimento), sacarose como fonte de carbono (substrato de crescimento) e água (veículo) (Garcia, 2004).

Para a obtenção da formulação veiculando *Bacillus cereus*, os constituintes utilizados foram ajustados com as seguintes concentrações finais: solução de Hoagland (1/10), *Saccharomyces cerevisiae* (1%), goma xantana (0,01%), Tween 80 (0,1%) e sacarose (0,1%).

A adição da formulação a placas de Petri contendo células de *Bacillus cereus* com 24 horas de crescimento em meio 523 sólido deu origem a uma suspensão de células do isolado que foi calibrada em espectrofotômetro (OD₅₄₀) para uma concentração final, na formulação, de 10⁸ UFC/mL. Aliquotas de 250 µL da suspensão obtida foram distribuídas em frascos tipo penicilina, previamente esterilizados a seco (120°C por 4 dias), contendo os seguintes presumidos agentes secantes: fubá (0,75g), celulose (0,5g) e sílica texturizada (0,3g). Decorrido o tempo de esterilização os frascos foram lacrados e mantidos em dessecador. O ensaio compôs-se de três repetições para cada secante, sendo que células de *B. cereus* ressuspendidas em água foram usadas como controle. As avaliações consistiram de diluição serial (fator 10) e contagem em placas de Petri do número de UFC/mL, aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após a montagem do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho pode-se observar que, dos três secantes avaliados, a sobrevivência de células foi maior quando se utilizou fubá como secante. Sílica texturizada e celulose comportaram-se, pela ordem, menos favoráveis a manutenção da viabilidade de células do isolado, não se observando entretanto diferença significativa entre os tratamentos e o tratamento controle (Figuras 1, 2, e 3).

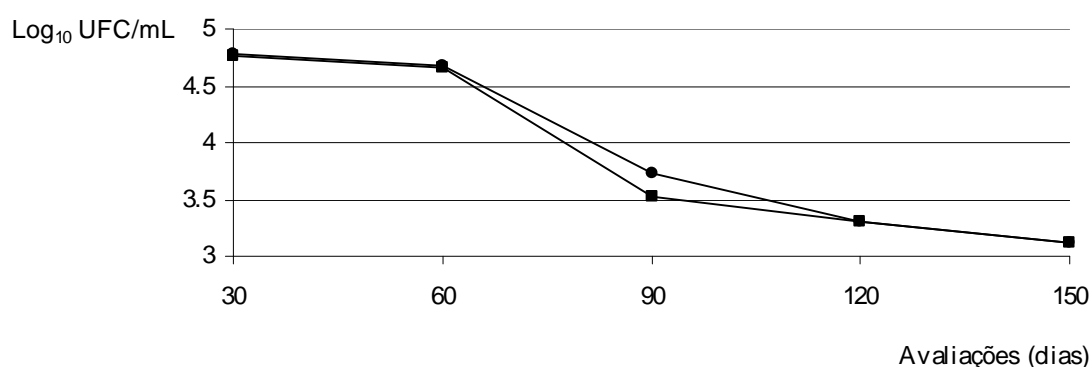


Figura 1 - Curva de sobrevivência do antagonista *Bacillus cereus*, veiculado na formulação proposta (?) e em água (◐), com adição de fubá como secante, em um período de 150 dias.

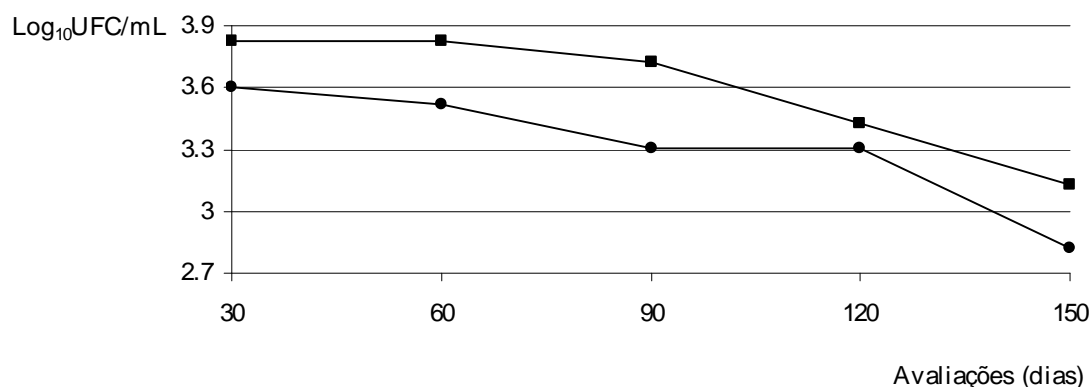


Figura 2 - Curva de sobrevivência do antagonista *Bacillus cereus*, veiculado na formulação proposta (?) e em água (◐), tendo celulose como agente secante, em um período de 150 dias.

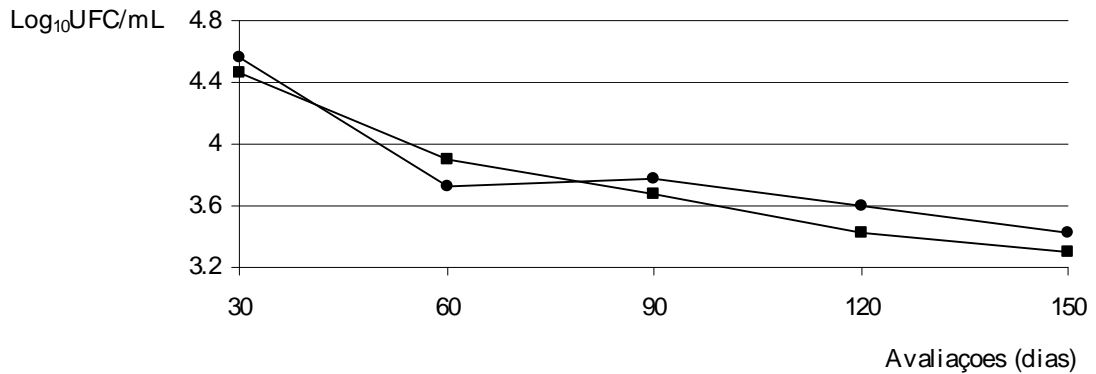


Figura 3 - Curva de sobrevivência do antagonista *Bacillus cereus*, veiculado na formulação proposta (?) e em água (|), com adição de sílica texturizada como secante, em um período de 150 dias.

Vários fatores podem ter contribuído para o insucesso na manutenção da viabilidade de *Bacillus cereus* na formulação proposta. Pode-se citar a possível aderência de células aos secantes e diminuição no número de células viáveis, alterações na concentração de oxigênio, nível de nutriente, temperatura de armazenamento, pH, dentre outros.

Földes et al. (2000) conseguiu aumentar o número e a capacidade de esporulação de uma espécie de *Bacillus*, utilizando-se de uma combinação de técnicas pelo uso de um meio enriquecido e tratamento térmico.

O uso de adjuvantes em uma formulação pode auxiliar na melhoria de sua eficiência e na proteção do antagonista, como fonte nutricional auxiliando seu estabelecimento, como espalhantes, agentes molhantes, supressores de espuma e solubilizantes (Medugno, 1995; Connick et al., 1990; Chiou e Wu, 2003).

Moënné-Loccoz et al. (1998), estudando os efeitos de preparação de inóculo e formulação na sobrevivência e eficácia do biocontrole de um strain de *Pseudomonas* preparado em uma mistura de vermiculita e EBTM (material consistido principalmente de

argila e partículas de madeira) para peletização de sementes de beterraba observaram uma redução no número de células viáveis. Porém, quando nutrientes foram adicionados à mistura e reduzidas as condições de secagem, a sobrevivência aumentou, apesar do declínio no tamanho da população na semente durante o armazenamento.

Para os propósitos práticos de uso de bactérias na agricultura, deve-se frisar que o gênero *Bacillus* apresenta certas vantagens em relação a outros gêneros, principalmente em relação à produção de inoculantes. Dentre estas vantagens, pode-se citar a resistência à dessecação, a formação de endósporos de resistência, a maior capacidade de sobrevivência quando formuladas com polímeros e inertes diversos, entre outras (Melo e Azevedo, 1998).

Estudos e validações a respeito de fatores relacionados à manutenção da viabilidade celular e efetividade de ação do microrganismo, a adição de adjuvantes, secantes, carreadores e nutrientes apropriados, a possibilidade de encapsulação de células, um maior controle de fatores culturais e o tipo de formulação provendo equilíbrio e eficácia ao processo, devem ser pesquisadas a fim de obter-se uma formulação passível de utilização e a possibilidade de uma correta implementação em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreopoulos, A. G., Tarantili, P. A. Xanthan Gum as a Carrier for Controlled Release of Drugs. **Journal of Biomaterials Applications**, v.16, p.34- 46. 2001.

Atlas, R. M., Bartha, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**. Menlo Park, California: Wesley Longman, Inc. 1946. 694 p.

Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729- 770. 1998.

Brock, T. D. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. 2003. 1019 p.

Cattelan, A. J., Hartel, P.G. Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG. p.213- 234, 2000.

Cavalcanti, L.S.; Resende, M.L.V.; Nojosa, G.B.A.; Santos, F.S.; Costa, J.C.B.; Ferreira, J.B.; Araújo, D.V.; Muniz, M.F.S.; Deuner, C.C.; Miranda, J.C. **Ativadores de resistência disponíveis comercialmente**. Anais da II Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas, UFLA, Lavras, p. 82- 97, 2004.

Chen, Y., Mei, R., Lu, S. Liu, L.; Kloepper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: R. S. G. Utkhede, V.K. (ed.). **Management of Soil Borne Diseases**. New Delhi: Kalyani Publishers, 1996, p.165- 184.

Chiou, A. L., Wu, W. S. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of lily grey mold (*Botrytis elliptica*). **Journal Phytopathology**, v. 151, p.13- 18, 2003.

Connick Júnior, W. J., Lewis, J. A., Quimby, P. C. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. In: Baker, R. R., Dunn, P. E. (eds.). **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and disease**. Alan Liss, Inc., New York, p. 345- 372. 1990.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Földes T., Bánhegyi I., Herpai Z., Varga L., Szigeti J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 840-846. 2000.

Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D., Connick Jr., W. J. Encapsulation of potential biocontrol agent in an alginate-clay matrix. **Phytopathology** 75, 774-777. 1985.

Garcia, F. A. O. **Efetividade de Formulações de Procariotas Residentes de Filoplano no Controle Biológico de Doenças do Tomateiro**. (Mestrado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2004. 53 p.

Gutierrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206-211. 2001.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969-976. 1970.

Kang, F. S., Pettit, D. J. Xanthan, gellan, welan and rhaman. Industrial Gums. In: J. N. R. L. B. Whistler (ed.). **Polysaccharides and Their Derivatives**. San Diego: Academic Press, p.341-399, 1993.

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Medugno, C. C. Formulação de agentes microbianos para o controle de fitopatógenos. In: Melo, I. S., Sanhueza, R. M. V. (eds.). **Métodos de**

seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna, SP: Embrapa – CNPMA. 47. 1995. 72 p.

Melo, I. S., Azevedo, J. L. **Controle Biológico.** Jaguariúna, SP: EMBRAPA- CNPMA, v.1. 1998. 262 p.

Moënne- Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'connor, B., O'gara, F. Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.108- 116, 1998.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras, MG: Editora UFLA. 2002. 626 p.

Nobbe, F. Hiltner, L. **Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.** 1896

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas.** Viçosa, MG: UFV. 2001. 279 p.

Russo, A., Moënne- Loccoz, Y., Fedi, S., Higgins, P., Fenton, A., Dowling, D.N., O'Regan, M. and O'Gara, F. Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 740-745. 1996.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliares e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.).** (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Stirling, G. R. **Biological Control of Plant Parasite Nematodes - Progress, Problems and Prospects.** Mekshom: Redwood Press. 1991. 282 p.

Suslow, T. V., Schroth, M. N. Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. **Phytopathology**, v.72, p.199- 206. 1982.

Trevors, J. T. van Elsas, J. D., Lee, H., van Overbeek, L. S. Use of alginate and others carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. **Microbial Release**, v.1, p.61- 69. 1992.

Valarini, M. J. Base Molecular da Interação Rhizobium- Leguminosa. In: I. S. Melo, Azevedo, J. L. (ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA- CNPMA, 1998. p.311- 326

Vidhyasekaran, P. M. M. Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. **Plant Disease**, v.79, p.782- 786. 1995.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, p.969- 987. 1982.

SISTEMICIDADE DE RESPOSTA INDUZIDA POR UM ISOLADO DE
Bacillus cereus EM PLANTAS DE TOMATEIRO (*Lycopersicon
esculentum* Mill.) E FORMA DE DISPENSA DA RIZOBACTÉRIA NA
PLANTA

RESUMO

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação com o intuito de se verificar a capacidade de *Bacillus cereus* em induzir resistência sistêmica em plantas de tomateiro, quando desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Plantas foram previamente pulverizadas com *B. cereus* no terço superior ou inferior da parte aérea das plantas com posterior arranquio das folhas pulverizadas, procedendo-se à inoculação com o referido patógeno. O ensaio revelou uma diminuição significativa da incidência da doença em plantas tratadas com *B. cereus* confirmando a sistemicidade da resposta tanto quando a pulverização se deu na parte inferior quanto na parte superior da parte aérea das plantas. Um ensaio de campo avaliando capacidade do isolado em proteger plantas de tomateiro contra requeima (*Phytophthora infestans*) e se a forma de dispensa da rizobactéria na planta poderia influenciar a performance do isolado, não obteve controle da epidemia, mesmo quando se avaliou a atuação do isolado sob diferentes formas de aplicação na planta. Observou-se, contudo uma menor severidade da doença nos tratamentos em que se utilizou a microbiolização sozinha ou quando em combinação com a pulverização da rizobactéria no filoplano de tomateiro quando comparados ao tratamento controle. Porém, quando se utilizou a rizobactéria via pulverização da parte aérea, observa-se um aumento da epidemia em relação aos demais tratamentos.

SYSTEMICITY OF INDUCED RESPONSE BY AN ISOLATE OF *Bacillus cereus* IN TOMATO PLANTS (*Lycopersicon esculentum* Mill.) AND APPLICATION FORM OF THE RHIZOBACTERIA ON THE PLANT

ABSTRACT

An experiment was carried out in greenhouse to verify the ability of *Bacillus cereus* to induce systemic resistance in tomato plants when challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. The plants were previously sprayed with the isolate of *Bacillus cereus* at the third lower or upper section of the aerial parts of plants followed by the removal of the sprayed leaves and then inoculating the pathogen. The essay showed a significant decrease of the incidence of a disease in plants treated with *B. cereus* confirming the response systemicity both when the spraying was made at the lower and at the upper section of the aerial parts of the plants. A field essay to evaluate the ability of the isolate to protect the tomato plant against late blight (*Phytophthora infestans*) and whether the application form of the rhizobacteria on the plant could influence the performance of the isolate did not control the epidemic, even when the action of the isolate was evaluated under various forms of application on the plant. It was observed, however, a decrease in the gravity of the disease in the treatments using the microbiolization alone or when combined with the spraying of the rhizobacteria on the leaves of tomato plants when compared to the control. Nevertheless when the rhizobacteria were used by the spraying of the aerial part, there was an increase of the epidemic in relation to the other treatment.

INTRODUÇÃO

A indução de resistência em plantas a patógenos tem sido reportada, segundo Ramammoorthy et al. (2001), desde a década de 30, sendo definida como uma aumentada capacidade defensiva de plantas contra um amplo espectro de patógenos, adquirida após estímulo apropriado.

Segundo Van Loon et al. (1998), a indução de resistência sistêmica por rizobactéria é referida como ISR, enquanto que para outras espécies é chamada SAR (resistência sistêmica adquirida). Ambas ativam mecanismos de resistência latentes na planta, expressos após exposição da planta ao patógeno (Van Loon, 1997).

Rizobactérias são bactérias saprófitas que vivem na rizosfera das plantas e são capazes de colonizar o sistema radicular agindo como promotoras do crescimento de plantas e no biocontrole de doenças (Chen et al., 1996, Liu et al., 1995), além de induzirem resistência a uma ampla gama de patógenos (Wei et al., 1991, Alström, 1991, Maurhofer et al., 1994, Wei et al., 1996). Sua utilização demonstra vantagem frente ao controle biológico clássico, cuja proteção se dá sobre poucos patógenos, além de poder atuar indiretamente na promoção de crescimento de plantas, alcançada pela maior sanidade da cultura devido ao aumento na capacidade defensiva desenvolvida pela planta.

A resistência induzida em plantas através de agentes bióticos ou abióticos mostra-se dependente de um intervalo de tempo entre o tratamento com o agente indutor e a subsequente inoculação do patógeno, a ausência de efeitos tóxicos sobre o organismo desafiante (patógeno) e a ausência de especificidade de proteção, sendo estes

alguns dos critérios estabelecidos por Steiner e Schönbeck (1995) para se considerar um microrganismo como indutor de resistência em plantas.

Vários pesquisadores têm relatado a capacidade de isolados de *Bacillus* em induzirem resistência sistêmica em plantas (Ryu et al., 2004, Silva et al., 2004, Osburn et al., 1995), e, dentro do gênero, *B. cereus* é relatado como indutor de resistência em plantas de tomateiro contra diferentes patógenos foliares da cultura (Silva et al., 2004, Vieira Júnior et al., 2005b).

Silva (2002) trabalhando com *Bacillus cereus* demonstrou que este isolado foi capaz de induzir resistência sistêmica em plantas de tomateiro com aumentada atividade de peroxidase e lipoxigenases nos extratos foliares destas plantas e, em experimento de campo, o autor comprovou a inespecificidade de proteção.

O objetivo deste trabalho foi comprovar a atividade de indução de resistência por um isolado de *Bacillus cereus*, previamente selecionado como indutor de resistência a doenças do tomateiro, utilizando-se como base os princípios de Steiner & Schönbeck (1995). Experimentos foram realizados para avaliar a capacidade de *B. cereus* em induzir resistência a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, em um bioensaio em casa de vegetação e a *Phytophthora infestans* em condições de campo e a avaliação da resposta na planta em função da forma de dispensa da rizobactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e seu cultivo

Utilizou-se para a condução dos ensaios um isolado de *Bacillus cereus*, obtido de rizosfera de plantas saudáveis de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG) e selecionado como indutor de resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro (Silva, 2002) e um isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* da coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Os dois isolados bacterianos foram cultivados em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e preservados em solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer - 80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo-a-tubo (Kiraly et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a - 4°C (Williams e Wellington, 1982).

Bioensaio em casa de vegetação

Plantas de tomateiro advindas de sementes não microbiolizadas foram cultivadas em casa de vegetação por 40 dias, em vasos contendo mistura estéril 3:1:1 de solo, areia, esterco. Avaliou-se a sistemicidade de resposta quando plantas eram expostas à suspensão bacteriana e posteriormente desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Para tal, partes aéreas de plantas de tomateiro foram espacialmente divididas em duas (terço superior e terceiro inferior) procedendo-se à pulverização, com suspensão de células de *Bacillus cereus* ($OD_{540} = 1,0$), em um total de dez repetições por tratamento.

Após 4 dias os folíolos pulverizados foram retirados procedendo-se à inoculação com o patógeno desafiante ($OD_{540} = 0,2$). Os tratamentos foram montados conforme sumarizado no quadro 1.

A avaliação foi feita pela contagem de lesões por folíolo, determinando-se o número médio de lesões por folíolo e aplicado o teste Tukey ao nível de significância de 5%, para comparação de médias.

Quadro 1 - Tratamentos empregados em bioensaio para avaliação da sistemicidade de resposta de plantas de tomateiro quando desfiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
Tratamento 1	Pulverização com <i>B. cereus</i> no terço superior e inoculação do patógeno no terço inferior
Tratamento 2	Pulverização com água no terço superior e inoculação do patógeno no terço inferior
Tratamento 3	Pulverização com <i>B. cereus</i> no terço inferior e inoculação do patógeno no terço superior
Tratamento 4	Pulverização com água no terço inferior e inoculação do patógeno no terço superior

Ensaio de campo

O experimento foi conduzido no Sítio Criciúma, município de Viçosa (MG), num período de 90 dias (setembro a novembro de 2003) após o transplântio, observando-se a ocorrência natural de doenças.

Bacillus cereus foi usado para microbiolizar sementes de tomateiro, cultivar Santa Clara. Após obtenção de uma suspensão homogênea de células pela adição de água destilada estéril a tubos contendo o antagonista, tal suspensão foi ajustada em

espectrofotômetro ($OD_{540} = 0,5$) e as sementes imersas nesta suspensão por 24 horas sob agitação. O controle consistiu de sementes imersas em água.

Plantas de tomateiro com 30 dias de idade, cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato PlantMax série prata foram utilizadas para a realização do ensaio de campo, montado no delineamento experimental de blocos casualizados, com 4 blocos e 4 repetições.

A cada 7 dias avaliou-se a intensidade da doença que incidiu sobre a cultura. A severidade da requeima foi avaliada quantificando-se a porcentagem de área foliar lesionada em toda a planta, através da avaliação visual com treinamento prévio feito no programa Severity Pro v. 1.0 (Nutter Jr., 1997).

Para avaliar se a forma de dispensa da rizobactéria teria influência na resposta da planta, cada bloco constituiu-se de 5 tratamentos, sumarizados no quadro 2.

Quadro 2 - Tratamentos empregados em experimento para indução de resistência sistêmica em tomateiro por *Bacillus cereus*.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
Tratamento M	Microbiolização de sementes com <i>Bacillus cereus</i>
Tratamento P	Pulverização de <i>B. cereus</i> em tomateiro a cada 7 dias.
Tratamento MP	Microbiolização e pulverização de <i>B. cereus</i> em tomateiro.
Tratamento T	Microbiolização de sementes com água
Tratamento F	Pulverização com Chlorotalonil a 2g/L i.a., a cada 7 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolado de *Bacillus cereus* utilizado neste trabalho foi relatado como indutor de resistência sistêmica em plantas de tomateiro, em experimentos avaliando a severidade de *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans* e *Septoria lycopersici* em condições de campo, comprovando a redução na incidência de doenças e a multiplicidade de resposta (Silva et al., 2004).

A avaliação do patossistema *P. infestans*-*B. cereus* em ensaio de campo não mostrou a eficiência da rizobactéria em induzir resistência sistêmica em tomateiro, mesmo quando se avaliou a atuação do isolado sob diferentes formas de aplicação na planta, não se obtendo controle da epidemia (Tabela 1).

A agressividade do patógeno, a ineficiência na ativação dos mecanismos de defesa induzidos pela rizobactéria contra *P. infestans*, as variações de temperatura e umidade verificadas durante a condução do experimento, a cultivar utilizada, o antagonismo exercido sobre a rizobactéria por microrganismos habitantes do solo e a baixa incidência da doença no campo podem ser indicadas como possíveis hipóteses para a não comprovação da capacidade de indução de resistência pelo isolado. Também se pode sugerir que o nível populacional da rizobactéria, no momento da colonização radicular tenha sido insuficiente para a indução, pois, apesar de um dos critérios formulados por Steiner e Schönbeck (1995) relatar a ausência de uma correlação dose-resposta, Van Loon et al. (1998) afirmam que deve existir um limite populacional mínimo da rizobactéria, para que esta possa ser efetiva em induzir a ativação de genes de resistência na planta.

Pieterse et al. (2004) sugerem que um reconhecimento específico entre a planta e a rizobactéria indutora de resistência é requerido para a indução de ISR e que esta é geneticamente determinada, existindo também relatos da ocorrência de uma indução diferencial entre ecotipos de *Arabidopsis* por diferentes autores (Van Wees et al., 1997, Ton et al., 1999).

Tabela 1 - Efeito de *Bacillus cereus* sob diferentes formas de aplicação no progresso da requeima em plantas de tomateiro.

TRATAMENTOS	SEVERIDADE
M - Microbiolização de sementes com <i>Bacillus cereus</i>	14,00 B ⁽¹⁾
P - Pulverização em tomateiro com <i>B. cereus</i>	18,85 AB
MP - Microbiolização de sementes e pulverização com <i>B.</i>	11,80 AB
T - Microbiolização de sementes com água	16,60 AB
F - Pulverização em tomateiro com Chlorotalonil	8,820 A

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância

Também segundo Steiner e Schöenbeck (1995), a indução de resistência é determinada pelo genótipo da planta, pressupondo significantes diferenças no nível e tipo de resistência em diferentes cultivares.

Vieira Júnior et al. (2005) trabalhando com nove diferentes cultivares de feijoeiro avaliando a capacidade de controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Vauterin, Hoste, Kersters e Swings 1995 constataram que não se obteve êxito no controle do patógeno no cultivar vermelhinho, enquanto todos os outros cultivares resultaram em resposta positiva para controle do patógeno, quando se utilizou um isolado putativamente indutor de resistência sistêmica na cultura.

Avaliação realizada investigando a capacidade da rizobactéria em inibir a germinação de esporângios de *P. infestans* em condições de laboratório revelou a capacidade do isolado em controlar a liberação de zoósporos (dados não mostrados), contrariamente ao encontrado por Halfeld- Vieira (2002), para a mesma espécie.

Gilbert et al. (1990) relatam a capacidade de lise de zoósporos de *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt 1886 por um isolado de *B. cereus*, correlacionando o fato de que a combinação do aumento do pH, o seqüestro de cálcio e a liberação de amônia tornam-se altamente tóxicos a estas estruturas.

O efeito inibitório sobre estruturas de *P. infestans* fere um dos princípios de Steiner e Schönbeck (1995), que relata a falta de qualquer efeito tóxico exercido pelo agente indutor sobre o patógeno desafiante como uma das premissas básicas para se considerar uma rizobactéria como indutora de resistência em plantas.

Van Loon et al. (1998) afirmam que a melhor evidência de ISR induzida por PGPR é obtida quando a rizobactéria não antagoniza o patógeno. Porém, quando a inibição não é observada em cultura, a inibição do patógeno *in vivo* não pode ser excluída, pois as condições ambientais diferem entre si. Partindo desta afirmativa, cabe aqui a observação da falta de correlação entre estudos *in vitro* e *in vivo* (Schroth e Hancock, 1981, Fravel, 1988), quando se comparam os resultados de inibição de germinação em condições de laboratório e a pulverização da rizobactéria no filoplano de tomateiro, que demonstrou um efeito deletério do isolado sobre a resposta da planta ao patógeno, verificado pelo aumento na severidade da doença, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 1). Ainda, em se tratando de um microrganismo de difícil cultivo, que demanda controle sob diferentes

parâmetros como, por exemplo, luminosidade, temperatura, fatores de crescimento, pode-se pressupor a falta de controle rígido de tais fatores como prejudicial ao pleno desenvolvimento do patógeno no bioensaio.

No tocante às diferentes formas de dispensa da rizobactéria na planta, vale ressaltar que tal avaliação visou o favorecimento da ação da mesma em relação ao patógeno e a avaliação do real status do isolado frente à indução de resistência sistêmica, baseando-se nos critérios propostos por Steiner e Schönbeck (1995).

Pôde-se observar uma menor severidade da doença nos tratamentos em que se utilizou a microbiolização sozinha ou quando em combinação com a pulverização da rizobactéria no filoplano de tomateiro, quando comparados ao controle. A avaliação do tratamento de pulverização da rizobactéria no filoplano de tomateiro demonstrou um efeito deletério do isolado na planta (Figura 1). Em todos os tratamentos avaliados não se observou variação significativa quando aplicado o teste Tukey a 5% de significância.

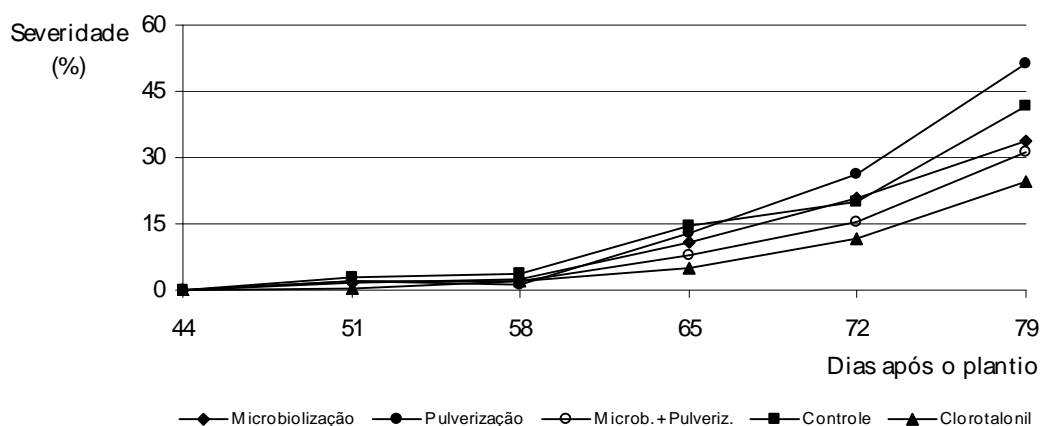


Figura 1 - Curva de progresso da requeima (*Phytophthora infestans*) em tomateiros provenientes de sementes microbiolizadas ou não e que receberam aplicações de solução de clorotalonil ou suspensão de células de *Bacillus cereus*.

A diminuição da severidade da doença pela utilização do tratamento combinado (microbiolização-pulverização) pode ser devida

a maior competição na parte aérea das plantas por espaço e nutrientes entre *B. cereus* e outros microrganismos, inclusive fitopatógenos, aliados à já sabida capacidade deste isolado em induzir resistência sistêmica em plantas de tomateiro.

Combinações de microrganismos tem sido também um método empregado visando o controle de doenças, levando a um aumento no nível de proteção na planta. Vários pesquisadores relatam a utilização de espécies de *Bacillus* em combinação com outros microrganismos, levando a um efeito sinérgico na supressão de doenças (Jetyianon et al., 2003, Benhamou et al., 1998).

Experimento em casa de vegetação para avaliação da sistemicidade de resposta de plantas de tomateiro a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* revelaram que a incidência da doença em plantas tratadas com *B. cereus* foi menor que no tratamento controle, tanto quando o isolado foi pulverizado na parte superior quanto na parte inferior da parte aérea de plantas de tomateiro (Figura 2), diferindo dos controles pelo teste Tukey a 5% de significância. Este resultado corrobora o relato de Silva (2002) sobre a capacidade do isolado em induzir resistência sistêmica em plantas de tomateiro, sob condições de casa de vegetação, quando confrontado com o referido patógeno bacteriano.

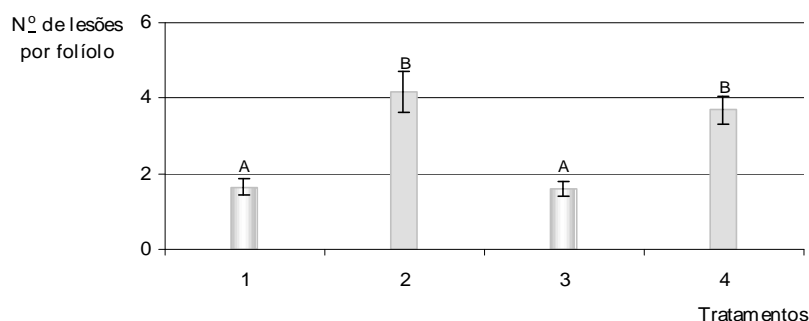


Figura 2 - Comparação de diferentes tratamentos na sistemicidade de resposta de plantas de tomateiro desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

Vieira Júnior et al. (2004), trabalhando com *B. cereus*, isolado de filoplano de folíolos de tomateiro também demonstraram a sistemicidade de resposta quando *P. syringae* pv. *tomato* era inoculada em tomateiro, após exposição prévia ao antagonista em diferentes partes da planta.

Apesar da falta de comprovação da capacidade de indução de resistência sistêmica para um patógeno em particular neste trabalho, não se pode concluir pela ineficácia do isolado, levando-se em consideração sua performance em trabalhos anteriores (Silva, 2002).

Segundo Bashan (1998) a resposta da atividade da rizobactéria pode variar consideravelmente em função da eficiência do isolamento bacteriano, da espécie da planta, do tipo de solo, da densidade do inoculante e das condições do ambiente, podendo estes fatores dificultar sua performance.

Fazem-se necessários estudos a respeito de fatores relacionados à manutenção da viabilidade celular e efetividade de ação do microrganismo no campo, a elaboração de uma formulação visando a manutenção de um microambiente favorável ao antagonista a fim de evitar seu declínio populacional, a adequação de um apropriado sistema de liberação do organismo na natureza visando uma maior adaptabilidade do organismo e a sustentabilidade do ecossistema na manutenção do equilíbrio como um todo, alcançando-se assim os benefícios advindos da aplicação de PGPR's no manejo integrado de doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alström, S. J. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. **Journal of General Applied Microbiology**, v.37, n.6, p.495- 501, 1991.

Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729- 770. 1998.

Benhamou, N., Kloepper, J. W., Tunzun, S. Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v.204, p.153- 168, 1998.

Chen, Y., Mei, R., Lu, S. Liu, L.; Kloepper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: R. S. G. Utkhede, V.K. (Ed.). **Management of Soil Borne Diseases**. New Delhi: Kalyani Publishers, 1996, p.165- 184.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Fravel, D. R. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p.75- 91, 1988.

Gilbert, G. S., Handelsman, J., Parke, J. L. Role of ammonia and calcium in lysis of zoospores of *Phytophthora cactorum* by *Bacillus cereus* strain UW85. **Experimental Mycology**, v.14, p.1- 8. 1990.

Halfeld Vieira, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura** (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002. 111 p.

Jetyianon, K., Fowler, W. D., Kloepper, J. W. Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. **Plant Disease**, v.87, n.11, p.1390- 1394. 2003.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969- 976. 1970.

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Liu, L., Kloepper, J. W., Tunzun, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, n.8, p.843- 847, 1995.

Maurhofer, M., Keel, C., Haas, C., Défago, G. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. **Plant Pathology**, v.84, p.139- 146, 1994.

Nutter Jr., F. W. Disease Severity Assessment Training. In: Franci, L. J., Neher, D. A. (Eds.) **Exercises in plant disease epidemiology**. St. Paul: APS Press, p. 1- 7, 1997.

Osburn, R. M., Milner, J. L., Oplinger, E. S., Smith, R. S., Handelsman, J. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two fields sites in Wisconsin. **Plant Disease**, v.79, p.551- 556, 1995.

Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Saskia, C. M., Van Wees, J. T., Verhagen, B. W. M. Léon-Kloosterziel, K., Hase, S., De Vos, M., Van Oosten, V., Pozo, M., Spoel, S., Van der Ent, S., Koornneef, A., Van Loon, L. C. Rhizobacteria- induced systemic resistance and pathway cross talk fine- tune defense. In: **Anais da II Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas e IV Simpósio de Controle de Doenças de Plantas**. Lavras, MG: UFLA, 2004. 115 p.

Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disases. **Crop Protection**, v.20, p.1- 11. 2001.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 279 p.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Paré, P. W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.134, p.1- 10. 2004.

Schroth, M. N., Hancock, J. G. Selected topics in biological control. **Annual Review Microbiology**, v.35, p.453- 476. 1981.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliares e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Steiner, U., Schönbeck, F. Induced resistance in monocots. In: R. Hammerschmidt, Kuc, J. (Ed.). **Induced Resistance to Disease in Plants**. Dordrech: Kluwer Academic Pub., p.86- 110. 1995.

Ton, J., Pieterse, C. M. J., Van Loon, L. C. Identification of a locus in *Arabidopsis* controlling both the expression of rhizobacteria- mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Molecular Plant- Microbe Interaction**, v.12, p.911- 918, 1999.

Van Loon, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis- related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, p.753- 765. 1997.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453- 83. 1998.

Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y. A. M., Hartog, F., Van Loon, L. C. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. **Molecular Plant- Microbe Interaction**, v.10, p.716- 724. 1997.

Vieira Júnior, J. R.; Romeiro, R. S., Ferraz, H. G. M. Efetividade de controle do cretamento bacteriano comum, por procariotas residentes

de filoplano de feijoeiro, em função da cultivar. In: XXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2005, São Paulo. **Summa Phytopathologica**. Jaboticabal, SP: Gráfica Santa Terezinha, v. 31, p. 55. 2005.

Vieira Júnior, J. R., Vieira, B. A. H., Romeiro, R. S., Neves, D. M. S. Procaríotas Residentes de Filoplano como indutores de resistência sistêmica à doenças do Tomateiro. In: II Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência & IV Simpósio de Controle de Doenças de Plantas, 2004, Lavras, MG. **Summa Phytopathologica**. Jaboticabal, SP: Grupo Paulista de Fitopatologia, v. 31, p. 175- 176. 2004

Wei, G., Kloepper, J. W., Tunzun, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, p.221- 224, 1996

Wei, G., Kloepper, J. W., Tunzun, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth- promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.81, n.12, p.1508-1512. 1991.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, p.969- 987. 1982.

SENSIBILIDADE *in vitro* DE UM ISOLADO DE *Bacillus cereus* A
SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS E DEFENSIVOS COMERCIAIS
UTILIZADOS NA CULTURA DO TOMATEIRO

RESUMO

Estudou-se a sensibilidade *in vitro* de um isolado de *Bacillus cereus* a antibióticos, com a finalidade de fornecer informações para o desenvolvimento de meios semi-seletivos auxiliando nos estudos de dinâmica populacional do isolado no meio ambiente e a compatibilidade do isolado a defensivos agrícolas utilizados na cultura do tomateiro, visando a utilização conjunta do tratamento químico e biológico para o controle de doenças de plantas. Os resultados demonstraram a possibilidade de utilização de determinadas substâncias antimicrobianas na elaboração de meios semi-seletivos para *B. cereus* e a ampla compatibilidade do isolado a diversos defensivos sejam eles fungicidas, inseticidas ou herbicidas, podendo tal microrganismo ser exposto aos diversos agrotóxicos, sendo possível sua utilização conjunta dentro de um programa de manejo integrado de doenças para a cultura do tomateiro.

In vitro SENSIBILITY OF A *Bacillus cereus* ISOLATE TO
ANTIMICROBIAL SUBSTANCES AND COMMERCIAL PESTICIDES
USED ON THE TOMATO PLANT CROP

ABSTRACT

The *in vitro* sensibility of an isolate of *Bacillus cereus* to antibiotics was studied in order to provide information for the development of semiselective media to aid studies on the populational dynamics of the isolate in the environment and the compatibility of the isolate with agricultural pesticides used in tomato plant cultivation, aiming at the combined use of chemical and biological treatments for the control of diseases in plants. The results showed the probability of using certain antimicrobial substances in the elaboration of semi selective media for *B. cereus* and a broad compatibility of the isolate with various pesticides, such as fungicides, insecticides or herbicides. This microorganism can be exposed to various pesticides, enabling its use together in an integrated management program for diseases of the tomato plant cultivation.

INTRODUÇÃO

A prática de utilização de pesticidas para controle de pragas e doenças na agricultura moderna levou o Brasil a ocupar o quarto maior mercado mundial de agrotóxicos (Campanhola e Bettiol, 2003). Apesar da lucratividade e abastecimento do mercado com alimentos de alta qualidade, problemas advindos do uso indiscriminado destes produtos tem levado a reflexos nocivos no ambiente (Campanhola e Bettiol, 2003), problemas à saúde humana (Roloff et al., 1992; Pommery et al., 1993), toxidez a organismos não- alvo (Marchini et al., 1988; Kasai et al., 1993; Melo e Azevedo, 1998; Gerhardson, 2002; Brock, 2003; Campanhola e Bettiol, 2003) e o desenvolvimento de resistência em fitopatógenos (Mcmanus et al., 2002; Melo et al., 2002; Moreira e Siqueira, 2002).

Cerca de 200 doenças, de diversas causas e etiologias, acometem a cultura do tomateiro, tornando-se o emprego de defensivos químicos na produção em escala comercial, uma prática obrigatória (Vale et al., 1992; Tigchelaar, 1993), prática esta sempre aliada a utilização de resistência genética do hospedeiro e o manejo cultural da planta (Emmert e Handelsman, 1999).

A utilização de microrganismos como agentes de controle biológico vêm sendo intensivamente estudada nas últimas décadas, visando seu emprego como estratégia dentro do manejo integrado de doenças (Thomashow e Weller, 1988; Bettiol, 1991; Melo e Azevedo, 1998; Emmert e Handelsman, 1999; Sabaratnam e Traquiar, 2002; Silva, 2002). Porém, o uso de microrganismos antagônicos visando o controle de patógenos tem deparado com obstáculos em sua implementação devido a dificuldade em elucidar a complexidade dos modos de ação destes microrganismos, o entendimento sobre a

interação microbiota-solo e a maior dependência do antagonista em relação ao ambiente (Gerhardson, 2002). Além disso, a exposição a pesticidas e outras substâncias tóxicas utilizadas na agricultura interferem nos diferentes níveis tróficos, afetando direta ou indiretamente o estabelecimento, manutenção e efetividade de ação de microrganismos no controle de doenças de plantas.

A possibilidade de utilização combinada de agentes de controle biológico e defensivos químicos no controle de doenças de plantas vem a ser uma importante alternativa no intuito de minimizar o uso de agrotóxicos (Freitas e Carneiro, 2000; Embrapa, 2002; Silva, 2002) na agricultura moderna levando a uma racionalização no uso das diversas tecnologias disponíveis visando a obtenção de um maior rendimento da cultura.

Para avaliar a magnitude do potencial de compatibilidade entre defensivos químicos, agentes antimicrobianos e o antagonista selecionado como agente de biocontrole de enfermidades do tomateiro, bioensaios *in vitro* foram conduzidos, com o objetivo de uma futura utilização em um sistema de manejo integrado, além de poder auxiliar na avaliação do impacto destes produtos sobre o crescimento e colonização de microrganismos no ambiente (Revellin et al., 1993; Freitas e Carneiro, 2000) e seu potencial de adaptabilidade a ambientes agrícolas (Slininger et al., 1996; Silva, 2002).

Em relação aos adjuvantes, o propósito da avaliação de compatibilidade entre *Bacillus cereus* e tais substâncias foi levar em consideração seu papel dentro de uma formulação, podendo-se utilizá-los em combinação ao microrganismo, para facilitar a liberação do isolado, aumentar sua atividade biológica e otimizar suas propriedades desejáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e preservação do microrganismo

Utilizou-se para a condução de todos os experimentos um isolado da rizobactéria UFV- 101, obtido de rizosfera de plantas sadias de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG). Este isolado foi previamente selecionado em experimentos de casa de vegetação e campo, mostrando-se efetivo em induzir resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro, sendo identificado como *Bacillus cereus* (Silva, 2002).

A preservação foi feita pela utilização das técnicas de solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer - 80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo- a- tubo (Kiraly et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a - 4°C (Williams e Wellington, 1982).

Antibiograma

A sensibilidade a diferentes antibióticos foi avaliada colocando-se o isolado em contato direto com discos de cada um dos compostos. O isolado foi cultivado em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) líquido por 24 horas a 28°C, sendo retirada uma alíquota de 300µL e adicionada a 30 mL do mesmo meio de cultura semi- sólido fundente que foi então vertido em placas de Petri. Após a solidificação, discos de papel contendo quantidades conhecidas de determinado antibiótico foram depositados sobre a superfície do meio, em pontos equidistantes. Foram feitas três repetições para cada substância. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas e, após este período, avaliou-se a presença ou não de halos de inibição através da medição do diâmetro do halo utilizando-se de uma régua milimétrica (Klement et al., 1990).

Foram testadas as seguintes substâncias, seguidas de sua concentração entre parênteses: ácido nalidíxico (30 µg), ácido oxolínico (30 µg), ácido pipemídico (20 µg), ácido clavulânico + amoxicilina (30 µg), amicacina (30 µg), amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), azitromicina (15 µg), aztreonam (30 µg), bacitracina (10 U.I.), carbenicilina (100 µg), cefaclor (30 µg), cefadroxil (30 µg), cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg), cefazolina (30 µg), cefepima (30 µg), cefetamet (10 µg), cefixima (5 µg), cefodizima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefuroxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), claritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), cotrimoxazol (25 µg), doxiciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), espiramicina (100 µg), estreptomicina (10 µg), fosfomicina (50 µg), furazolidona (100 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), kanamicina (30 µg), levofloxacina (5 µg), lincomicina (2 µg), lomefloxacina (10 µg), neomicina (30 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), nitrofurazona (50 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (5 µg), optoquina (5 µg), oxacilina (1 µg), pefloxacina (5 µg), penicilina (10 µg), polimixina (300 µg), rifampicina (5 µg), sulbactam (10 µg) + ampicilina (10 µg), sulfadiazol (25 µg), sulfazotrim (25 µg), sulfonamida (300 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), tianfenicol (30 µg), ticarcilina (75 µg) + ácido clavulânico (10 µg), tobramicina (10 µg), trimetoprim (5 µg), vancomicina (30 µg).

Sensibilidade a produtos de uso agrícola

Através de um bioensaio *in vitro* adaptado de Klement et al. (1990), a sensibilidade do isolado a diferentes substâncias antimicrobianas de uso agrícola para a cultura do tomateiro foi avaliada, colocando-se o isolado em contato direto com discos de

papel embebidos a cada um dos produtos. Foram testadas três concentrações de diversos fungicidas, inseticidas, herbicidas e adjuvantes, obtidas pelo uso do volume de calda a ser aplicado na dose recomendada, metade da dose e seu dobro, com três repetições por dose. Meio de cultivo 523 semi-sólido contendo células de *B. cereus* foi vertido em placas de Petri, onde se distribuiu de forma equidistante, discos de papel contendo quantidades conhecidas de determinado produto. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas, quando se avaliou a presença ou não de halos de inibição ao redor dos discos de papel, utilizando-se de uma régua milimétrica.

Foram testados os seguintes produtos, seguidos da dose comercial recomendada entre parênteses: Fungicidas: Amistar (azoxistrobina: 80-160g/ha), Cercobin 700 PM (tiofanato metílico: 70g/100L H₂O), Cerconil (clorotalonil + tiofanato metílico: 200g/100L H₂O), Cobox (oxicloreto de cobre: 200g/100L H₂O), Comet (piraclostrobina: 40mL/100L H₂O), Cupravit (oxicloreto de cobre: 300g/100L H₂O), Daconil BR (clorotalonil: 200g/100L H₂O), Folicur 200 CE (tebuconazole: 1L/ha), Forum (dimetomorfe: 150g/100L H₂O), Manzate 800 (mancozebe: 3Kg/ha), Ridomil (mancozebe + metalaxil M: 2,5Kg/ha), Sialex 500 (procimidona: 1,5-2Kg/ha), Thiovit Sandoz (enxofre: 350g/100L H₂O); Inseticidas: Actara 250 WG (tiametoxam: 16-20g/100L H₂O), Confidor 700 GrDa (imidacloprido: 200g/ha), Decis 25 CE (deltametrina: 30-50mL/100L H₂O), Pirate (clorfenapir: 25-50mL/100L H₂O), Vertimec (abamectina: 75-100mL/100L H₂O); Herbicidas: Fusilade 125 (flusifop-p-butílico: 2L/ha), Sencor BR (metribuzin: 0,7Kg/ha).

Além dos produtos registrados para a cultura do tomateiro, testaram-se também alguns adjuvantes utilizados em formulações, a saber: Blendmax K (1% v:v); Break-thru (0,15% v:v); Dyne-amic

(0,5% v:v); Glicerina (0,5% v:v); Intac (1,5% v:v); Kinetic (0,5% v:v); Metamucil (0,5% v:v); Óleo Mineral (5% v:v); Silwet L77 (0,2% v:v); Sun Spray Oil (3% v:v); Tween 80 (0,2% v:v).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de compatibilidade entre o isolado e os antibióticos mostrou que, das 66 substâncias testadas, 22 não tiveram efeito sobre o crescimento bacteriano. *Bacillus cereus* demonstrou um grau variável de sensibilidade aos demais antibióticos (Tabela 1).

Tabela 1. Sensibilidade de um isolado de *Bacillus cereus* a diferentes antibióticos.

Halo de inibição (cm)	Antibióticos
0,0 - 1,0	ácido pipemídico, carbenicilina, cefazolina, penicilina, ticarcilina + ácido clavulânico
1,1 - 2,0	amicacina, bacitracina, cefaclor, cefadroxil, cefalexina, cefalotina, espiramicina, estreptomina, gentamicina, lincomicina, neomicina, novobiocina, pefloxacina, rifampicina, sulbactam + ampicilina, tetraciclina, tianfenicol, tobramicina, vancomicina
2,1 - 3,0	ácido nalidíxico, ácido oxolínico, azitromicina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, cotrimoxazol, eritromicina, fosfomicina, furazolidona, kanamicina, levofloxacina, lomefloxacina, netilmicina, nitrofurantoína, nitrofurazona, norfloxacina, ofloxacina, teicoplanina

Antibióticos compatíveis: ácido clavulânico + amoxicilina, amoxicilina, ampicilina, aztreonama, cefepime, cefetamet, cefodizima, ceftriaxona, cefixima, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, doxiciclina, optoquina, oxacilina, polimixina, sulfadiatrim, sulfazotrim, sulfonamidas, trimetoprim.

Vários autores relatam que uma ampla gama de espécies de *Bacillus* é produtora de bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina (Brock, 2003). Porém, o isolado testado mostrou-se sensível a bacitracina, kanamicina e tetraciclina, demonstrando a variabilidade dentro de uma mesma espécie, quando se compara ao relatado no Manual de Bergey (Sneath et al., 1984) para *B. cereus*, que descreve a espécie como resistente a bacitracina, kanamicina, ampicilina tetraciclina e colistina, resistência esta dependente do tipo e concentração do antibiótico e capaz de influenciar os diversos processos de crescimento vegetativo, esporulação e germinação da bactéria.

Apesar do potencial de uso de antibióticos no tratamento de doenças de plantas, especialmente as de etiologia bacteriana, o uso destas substâncias na agricultura tem sido limitado devido a emergência de strains resistentes (Mcmanus et al., 2002), o alto custo do tratamento (Bergamin Filho e Kimati, 1995) e a descoberta de determinantes homólogos de resistência em bactérias associados a plantas, solo, animais e humanos (Sundin e Bender, 1996), o que leva a hipóteses do desenvolvimento de resistência em patógenos humanos através do consumo de alimentos tratados com antibióticos (Mcmanus et al., 2002).

Com relação aos fungicidas, herbicidas e inseticidas testados, o isolado se mostrou sensível a clorotalonil, mancozebe, tebuconazol, captan e tiram, nas três doses testadas (Tabela 2). A compatibilidade do microrganismo aos demais produtos confirma a possibilidade de seu uso na microbiolização de sementes, aliado a pulverizações aéreas na cultura. Porém, como o isolado se mostrou sensível aos fungicidas captan e thiram, produtos estes utilizados para tratamento de sementes, a microbiolização deve ser limitada aos casos em que se

dispõe de sementes não tratadas como, por exemplo, no sistema de produção orgânica, que reconhece na utilização de microrganismos não modificados uma das alternativas para o controle de pragas e doenças na agricultura.

Os estudos relacionados à compatibilidade do isolado a diferentes adjuvantes, considerados substâncias inertes e sem restrições para liberação no ambiente e utilizadas no desenvolvimento de formulações carreando microrganismos, demonstrou que a multiplicação do isolado não foi afetada. Esta compatibilidade permite a utilização combinada do isolado a adjuvantes para a obtenção de uma formulação que possa ser utilizada em um programa de manejo integrado de doenças, provendo equilíbrio e eficácia ao processo.

Tabela 2 - Sensibilidade *in vitro* de *Bacillus cereus* (UFV 101) a pesticidas recomendados para a cultura do tomateiro e adjuvantes utilizados em formulações.

Produtos Testados	Halo médio de inibição (cm)		
	Dose Recomendada	2X Dose	½ Dose
Daconil BR	0,9	0,933	0,6
Folicur 200 CE	0,667	0,9	0,433
Manzate 800	0,766	0,966	0,833
Thiram 0,2%	1,7	1,6	1,0
Orthocide 500	0,86	1,0	0,9

Produtos compatíveis: Fungicidas: Amistar, Cercobin 700 PM, Cerconil, Cobox, Comet, Cupravit, Forum, Ridomil, Sialex 500, Thiovit Sandoz; Inseticidas: Actara 250 WG, Confidor 700 GrDa, Decis 25 CE, Pirate, Vertimec; Herbicidas: Fusilade 125, Sencor BR; Adjuvantes: Blendmax K, Break-thru, Dyne-amic, Glicerina, Intac, Kinetic, Metamucil, Óleo Mineral, Silwet L77, Sun Spray Oil, Tween 80.

Avaliando-se os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a possibilidade de utilização de *Bacillus cereus* aliada a defensivos químicos no controle de doenças de plantas pode vir a ser uma importante alternativa na obtenção da efetividade de ação do microrganismo, a diminuição do uso de agrotóxicos e a prática de uma agricultura ecologicamente correta dentro de uma estratégia de manejo integrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergamim Filho, A, Kimati, H. A. (eds.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo, SP: Editora Agronômica Ceres, v. 1. 1995. 919 p.

Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA. 1991. 388 p.

Brock, T. D. **Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs. 2003. 1019 p.

Campanhola, C., Bettiol, W. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente. 2003. 279 p.

Balanco Ambiental. Brasília - DF. Embrapa, 2002. 67p.

Emmert, E. A. B., Handelsman, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v.171, p.1- 9. 1999.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Freitas, L. G., Carneiro, R. M. D. G. Controle Biológico de Fitonematóides por *Pasteuria* spp. In: I. S. Melo, Azevedo, J. L. (ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna - SP: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p. 191- 216, 2000.

Gerhardson, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.338- 343. 2002.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969- 976. 1970.

Kasai, F., Takamura, N., Hatakeyama, S. Effect of smetryne on growth of various freshwater algal taxa. **Environmental Pollution**, v.79, p.77- 83. 1993.

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó. 1990. 568 p.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Marchini, S., Passerini, L., Cesareo, D., Tosato M. L. Herbicidal triazines: Acute toxicity on *Daphnia*, fish and plants and analysis of its relationships with structural factors. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v.16, p.148- 57. 1988.

Mcmanus, P. S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L.. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Review Phytopathology**, v.40, p.443-465. 2002.

Melo, I. S., Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA- CNPMA, v.1. 1998. 262 p.

Melo, I. S., Valadares-Inglis, M. C., Nass, L. L., Valois, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismos**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA - Meio Ambiente. 2002. 743 p.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras, MG: Editora UFLA. 2002. 626 p.

Pommery, J., Mathieu, M., Mathieu, D., Lhermitte, M. Atrazine in plasma and tissue following atrazine- amino- triazole- ethylene glycolformaldehyde poisoning. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v.31, p.323- 31. 1993.

Revellin, C., Leterme, P., Catroux, G. Effect of some fungicide seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Biology Fertility of Soils**, v.16, p.211- 214. 1993.

Roloff, B. D., Belluck, D. A., Meisner, L. F. Cytogenic studies of herbicide interactions *in vitro* and *in vivo* using atrazine and linuron. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.22, p.267- 671. 1992.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV. 2001. 279 p.

Sabaratnam, S., Traquiar, J. A. Formulation of a *Streptomyces* Biocontrol Agent for the Suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in Tomato Transplants. **Biological Control**, v.23, p.245- 253. 2002.

Silva, H. S. A. **Rizobactérias como Indutoras de Resistência a Patógenos Foliares e como Promotoras de Crescimento de Plantas de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. (Doutorado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2002. 78 p.

Slininger, P. J. Van Cauwenberge, J. E., Bothast, R. J., Weller, D. M., Thomashow, L. S., Cook, R. J. Effect of growth culture physiological state, metabolites and formulation on the viability, phytotoxicity and efficacy of the take- all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.391- 398. 1996.

Sneath, P.H.A., 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins, Co., Baltimore, Md., pp: 1104- 1139.

Sundin, G. W., Bender, C. L. Dissemination of the strA-strB streptomycin resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. **Molecular Ecology**, v.5, p.133- 143. 1996.

Thomashow, L. S., Weller, D. M. Role a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal Bacteriology**, v.170, p.3499- 508. 1988.

Tigchelaar, E. C. Botany and culture of tomato. In: Jones, J. B., Stall, R. E., Zitter, T. A. (eds.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, New York, 1993. p. 2- 4.

Vale, F. X. R., Zambolim, L., Chaves, G. M., Correia, L. G. Avaliação fitossanitária da cultura do tomateiro em regiões produtoras de Minas Gerais e Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 753- 765. 1992.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, p.969- 987. 1982.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOCONTROLE DE NEMATÓIDE
DAS GALHAS (*Meloidogyne incognita*) E MURCHA BACTERIANA
(*Ralstonia solanacearum*) EM PLANTAS DE TOMATEIRO POR UM
ISOLADO DE *Bacillus cereus*

RESUMO

Ensaio objetivando o biocontrole de *Ralstonia solanacearum* em infectário e *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação pela microbiolização de sementes de tomateiro com um isolado de *Bacillus cereus*, relatado como indutor de resistência à cultura, demonstraram que o isolado não foi efetivo no controle das epidemias. No infectário, plantas de tomateiro microbiolizadas com *B. cereus* demonstraram uma menor suscetibilidade ao patógeno, por um período de 30 dias, porém igualaram-se ao tratamento controle após este período. *Meloidogyne incognita* também não foi controlado pelo antagonista, e os resultados obtidos mostraram inclusive que *B. cereus* propiciou um aumento na incidência da doença.

EVALUATION OF THE POTENTIAL OF BIOLOGICAL CONTROL OF
THE ROOT- KNOT NEMATODE (*Meloidogyne incognita*) AND
BACTERIAL WILT (*Ralstonia solanacearum*) IN TOMATO PLANTS BY
A *Bacillus cereus* ISOLATE

ABSTRACT

Essays aiming at the biological control of *Ralstonia solanacearum* in an "infectário" (infested microplot), and of *Meloidogyne incognita* in greenhouse by the microbiolization of tomato seeds with an isolate of *Bacillus cereus*, reported as an resistance inducer of the culture, showed that the isolate was not effective in the control of the epidemics. In the infectário, tomato plants treated with *B. cereus* showed less susceptibility to the pathogen during a period of 30 days. However, after this period, the susceptibility was equal to that of the control treatment. *Meloidogyne incognita* was also not controlled by the isolate and, in addition, the results obtained showed that *B. cereus* favored an increase of the incidence of the disease.

INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é uma das principais olerícolas cultivadas e, por ser uma atividade agrônômica altamente intensiva, a aplicação de insumos e artifícios tecnológicos no controle de doenças são exigências constantes para o êxito de seu cultivo. Entretanto, perdas consideráveis na cultura podem advir de doenças causadas por patógenos radiculares, principalmente pela falta ou quebra de resistência dentro dos cultivares, pela ineficiência da rotação de culturas para patógenos que possuem uma ampla gama de hospedeiros e elevada sobrevivência no solo e a inexistência de um produto químico eficaz no controle e inócuo ao meio ambiente.

A abertura de mercado a produtos cultivados com menor uso de agroquímicos, a demanda dos agricultores por produtos que possam manter a produtividade da cultura e as dificuldades inerentes ao controle destes patógenos tem impulsionado as pesquisas no sentido de se buscar alternativas para o controle destas fitomoléstias.

Neste sentido, a utilização de rizobactérias com o objetivo de aumentar a produção tem sido estudada em diversas culturas, além de merecerem especial atenção como biocontroladoras de enfermidades de plantas (Kloepper e Schroth, 1981, Bashan, 1998, Kloepper et al., 1991).

Aspectos relacionados à sanidade da planta e do solo incluem o impacto na supressão de patógenos por rizobactérias em diferentes sistemas agrícolas, a importância da ciclagem de nutrientes, as interações ecológicas entre microrganismos deletérios e a microflora e

microfauna do solo (Barker, 2003, Barker e Koenning, 1998, Ferris et al., 1997, Kloepper et al., 1992, Poidel et al., 2001), entre outros.

Recentes estudos têm demonstrado que algumas rizobactérias podem agir indiretamente induzindo resistência sistêmica em plantas contra fungos de solo e nematóides (Wei et al., 1996, Hasky-Günter et al., 1998, Reitz et al., 2000, Siddiqui e Shaukat, 2002a, b) e através da ação antagônica direta, obtendo-se relatos de sucesso no controle de fitonematóides em diferentes culturas (Oostendorp e Sikora, 1989, Sikora, 1988, Habe, 1997, Neves et al., 2000) e na ação direta de *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) Sayre e Starr, 1986, um parasita obrigatório de nematóides, especialmente ativo contra espécies de *Meloidogyne* (Brown e Nordmeyer, 1985, Barker, 2003).

Fungos e bactérias são dois dos maiores grupos de microrganismos habitantes do solo que mostram grande potencial como agentes de biocontrole de nematóides (Jatala, 1986, Weller, 1988, Sayre e Walter, 1991, Stirling, 1991, Siddiqui e Mahmood, 1999), encontrando-se diversas rizobactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Streptomyces* (Siddiqui e Mahmood, 1999) e *Bacillus* (Habe, 1997, Sikora, 1988, Racke e Sikora, 1992a, b, Anter et al., 1995, Siddiqui e Mahmood, 1999) capazes de controlar estes fitoparasitas.

Barker (2003) relata que poucos biocontroladores comerciais para nematóides fitoparasitas (a maioria veiculando fungos) têm sido desenvolvidos e que também tem mostrado um sucesso limitado. Sugere ainda que uma estratégia promissora para o biocontrole de patógenos de solo seja a utilização de rizobactérias, inclusive em conjunto a práticas culturais, como relatado por Kloepper et al. (1992) que observaram um aumento da atividade de bactérias antagonísticas a

Heterodera glycines Ichinohe, 1952 e *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949 na rizosfera de plantas de soja sob rotação de cultura.

Trabalhos objetivando o controle da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* têm também sido relatados com sucesso no campo experimental (Kempe e Sequeira, 1983, Trigalet et al., 1994, Shekhawat et al., 1994, Anith et al., 2004, Mariano et al., 1992a, b, Araujo, 1995, Moura, 1996), contudo os resultados obtidos ainda não suportam uma recomendação de uso prático.

Estudos envolvendo o gênero *Bacillus* relacionados à supressão de organismos patogênicos associados a rizosfera levam em consideração sua ampla ocorrência de forma natural e em elevadas populações, sua versatilidade nutricional, sua habilidade de crescer em uma ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de *Bacillus cereus* atuar no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomateiro, sob condições experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e seu cultivo

Utilizou-se para a condução dos ensaios um isolado de *Bacillus cereus*, obtido de rizosfera de plantas sadias de tomateiro em plantio comercial no município de São Geraldo (MG) e selecionado como indutor de resistência contra diversos patógenos que incitam doenças em plantas de tomateiro (Silva et al., 2004). A população de *Meloidogyne incognita* foi doada pelo Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e para o ensaio com *Ralstonia solanacearum* foi utilizado um infectário localizado na Embrapa Agrobiologia – Seropédica (RJ).

O isolado bacteriano foi cultivado em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e preservado em solo esterilizado (Lelliott e Stead, 1987), água estéril (Fahy e Persley, 1983), freezer - 80°C (Romeiro, 2001) e por repicagens quadrimestrais, tubo-a-tubo (Kiraly et al., 1970), sendo os tubos mantidos sob refrigeração a - 4°C (Williams e Wellington, 1982).

Para a multiplicação de *Meloidogyne incognita*, plantas de tomateiro foram cultivadas em mistura estéril (2:1) de areia e solo, mantidas em casa de vegetação sendo utilizadas para o preparo do inóculo.

Microbiolização de sementes

Células de *Bacillus cereus* foram usadas para microbiolizar sementes de tomateiro, cultivar Santa Clara. Após obtenção de uma suspensão homogênea de células pela adição de água destilada estéril a tubos contendo o antagonista, tal suspensão foi calibrada em espectrofotômetro ($OD_{540} = 0,5$) e as sementes imersas nesta suspensão por 24 horas sob agitação. O controle consistiu de sementes imersas em água.

Preparo do inóculo de *Meloidogyne incognita* e inoculação das plantas

Suspensão do patógeno foi preparada segundo Boneti e Ferraz (1981). Tal suspensão foi inoculada na proporção de 2000 juvenis de segundo estágio por copo, com uma muda de tomateiro de 7 cm de altura e 2 folhas verdadeiras. A suspensão foi colocada ao redor das raízes de modo que o patógeno ficasse o mais próximo possível do sistema radicular.

Bioensaio em casa de vegetação

Meloidogyne incognita foi inoculado em plantas de tomateiro advindas de sementes microbiolizadas ou não com *Bacillus cereus* e cultivadas em mistura estéril (2:1) de areia e solo por 15 dias em casa de vegetação. Após um período de 30 dias, a avaliação da capacidade de biocontrole do patógeno pelo antagonista foi realizada avaliando-se os pesos da matéria fresca de raiz e matéria seca de folhas, contagem do número de galhas/raiz e do número de ovos/raiz, sendo estes dados analisados pelo teste Tukey a 5% de significância.

Bioensaio em infectário

Plantas de tomateiro com 30 dias de idade, microbiolizadas com *Bacillus cereus* e cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato PlantMax série prata foram utilizadas para a realização do ensaio, em delineamento experimental inteiramente ao acaso. Plantas advindas de sementes embebidas em água foram utilizadas como tratamento controle.

Durante um período de 64 dias acompanhou-se o progresso da doença, avaliando-se a cada 4 dias a porcentagem de folhas murchas por planta e comparando-se ao número total de folhas e os dados obtidos avaliados pelo teste Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio realizado em infectário de *Ralstonia solanacearum*, visando o biocontrole do patógeno por um isolado de *Bacillus cereus* não se mostrou efetivo. Apesar disso, pode-se observar uma menor incidência da doença em um período entre os 35 e 67 dias após o transplante de plantas de tomateiro microbiolizadas com *B. cereus*, quando comparadas as plantas controle (Figura 1).

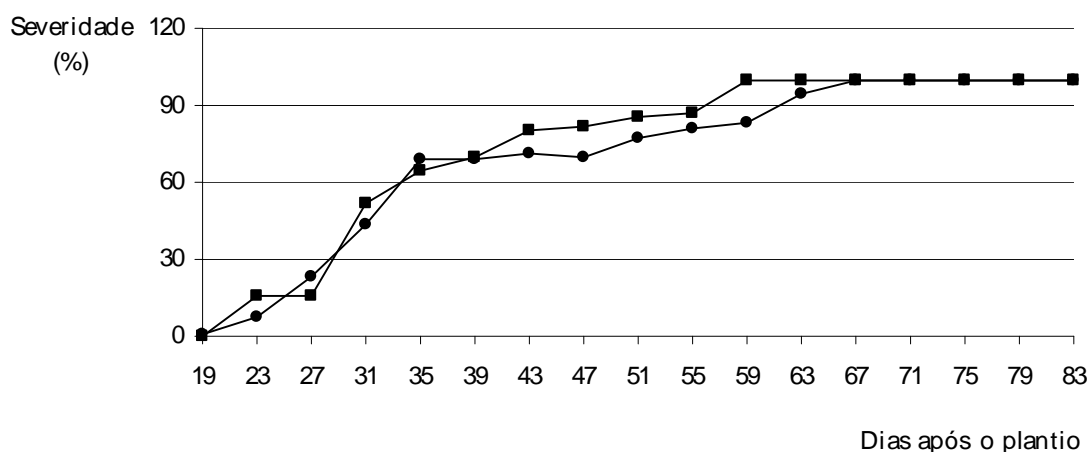


Figura 1 - Curva de progresso da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomateiro submetidas a microbiolização de sementes com *Bacillus cereus* (●) quando comparadas ao controle (◻) após cultivo em infectário por 83 dias.

Os sucessivos cultivos de solanáceas no infectário resultando em um elevado nível populacional e homogeneidade de distribuição do patógeno, condições de umidade e temperaturas elevadas durante o desenvolvimento do ensaio, além de possíveis fermentos nas raízes durante o transplante das mudas podem ter favorecido a infecção e severidade da doença, não se observando atividade de biocontrole do patógeno. Porém, apesar do rápido desenvolvimento da doença, nota-se a capacidade de plantas advindas de sementes microbiolizadas com suspensão de *B. cereus* em resistir por mais tempo à

infecção causada pelo patógeno. Uma explicação para o fato pode ser a capacidade do isolado utilizado em induzir resistência em plantas de tomateiro contra diferentes patógenos que afetam a cultura (Silva et al., 2004), capacitando a planta a conviver com o patógeno por mais tempo em um solo com elevado potencial de inóculo. Segundo Bashan (1998), a resposta da atividade da rizobactéria pode variar consideravelmente em função da eficiência do isolamento bacteriano, da espécie da planta, do tipo de solo, da densidade do inoculante e das condições do ambiente.

Experimento em casa de vegetação para avaliação da capacidade de *B. cereus* em controlar *Meloidogyne incognita* afetando plantas de tomateiro revelaram que a incidência da doença em plantas tratadas com *B. cereus* não diferiu estatisticamente dos controles pelo teste Tukey a 5% de significância (Figuras 2, 3 e 4).

Stirling (1991) afirma que o controle biológico de nematóides não é restrito apenas às interações entre estes fitopatógenos e seus antagonistas, mas ambos são influenciados pela planta, pelo ambiente físico e pela microflora e microfauna do solo. Também a deficiência ou fragmentação do entendimento dos diversos fatores que afetam as inter-relações que regem o potencial biológico dos agentes de controle pode ser um fator limitante ao sucesso do biocontrole.

Os dados apresentados demonstram que *Bacillus cereus* não é capaz de controlar os patógenos *Ralstonia solanacearum* e *Meloidogyne incognita*, em condições experimentais. Porém, avaliando-se o resultado obtido com o ensaio em infectário para a murcha bacteriana e sabendo-se da grande importância desta doença na cultura do tomateiro, faz-se necessário determinar se a rizobactéria pode estar agindo como indutora de resistência sistêmica em relação

ao referido patógeno, além de estudar aspectos relacionados à adequação de um apropriado sistema de liberação do organismo na natureza visando à manutenção da viabilidade celular e efetividade de ação do microrganismo.

Uma melhor compreensão do significado e modo de ação das PGPR, fatores influenciando sua atuação ecológica e o desenvolvimento de tecnologias de inoculação ainda devem ser aperfeiçoados visando sua utilização efetiva no manejo integrado de doenças de plantas.

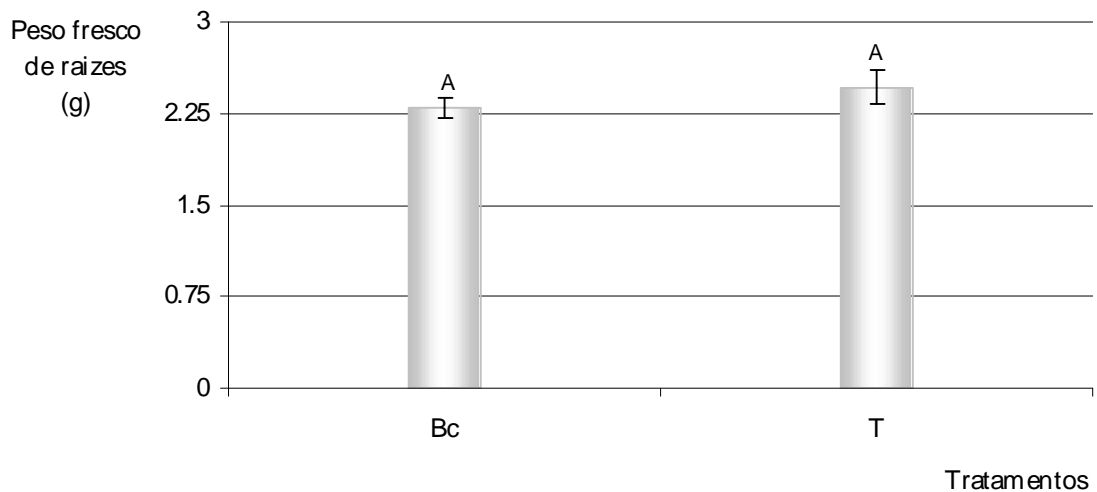


Figura 2 - Peso da matéria fresca de raízes de tomateiro advindas de sementes microbiolizadas (Bc) ou não (T) com *Bacillus cereus* e desafiadas com *Meloidogyne incognita*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

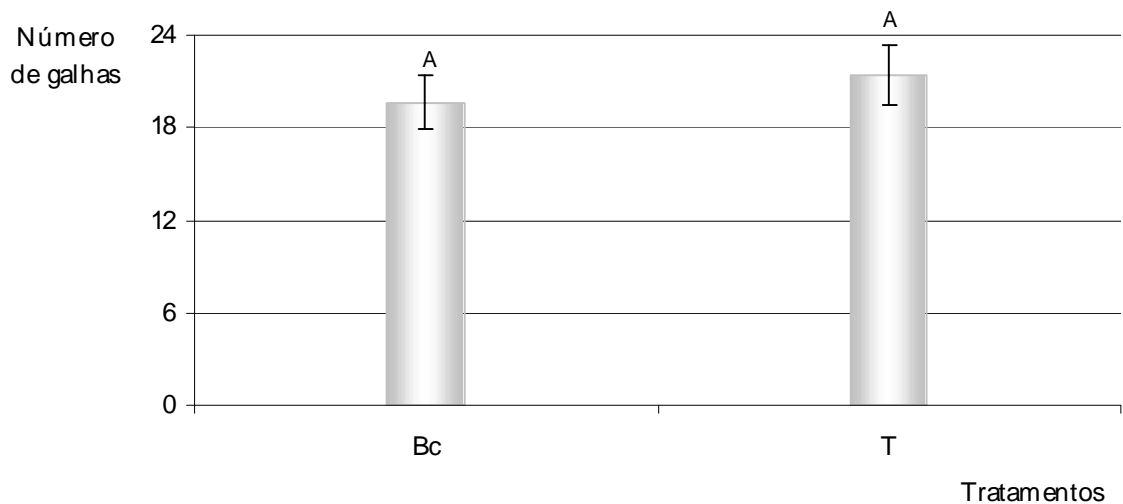


Figura 3 - Número de galhas de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro submetidos à prévia microbiolização de sementes com suspensão de um isolado de *Bacillus cereus* (Bc) e comparado ao controle (T). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

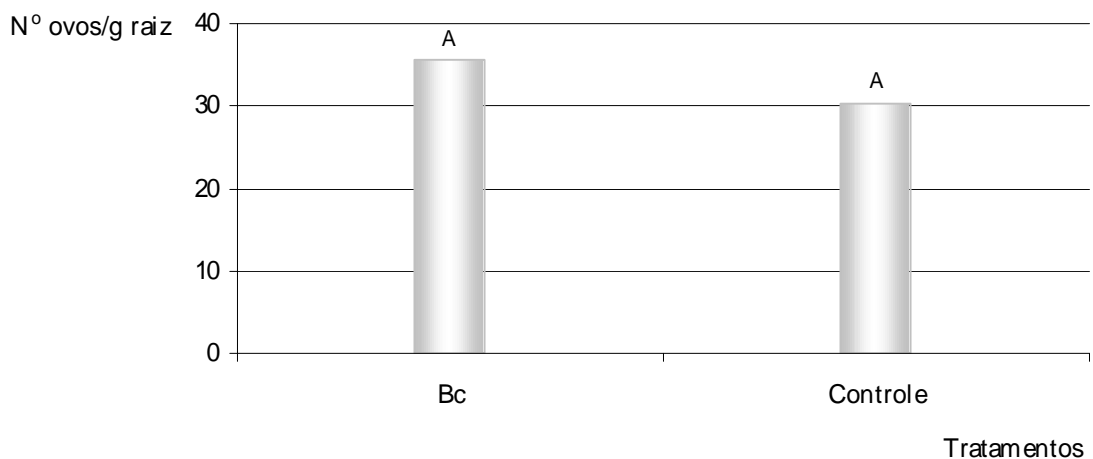


Figura 4 - Número de ovos de *Meloidogyne incognita* por raiz de plantas de tomateiro, quando sementes foram submetidas ou não à prévia microbiolização com suspensão de um isolado de *Bacillus cereus* (Bc), comparando-se ao controle. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anith, K. N., Momol, M. T., Kloepper, J. W., Marois, J. J., Olson, S. M., Jones, J. B. Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and soil amendment for integrated management of bacterial wilt on tomato. **Plant Disease**, v.88, p.669- 673. 2004.

Anter, E. A., Abd Elgawad, M. M., Ali A. H. Effects of fenamiphos and biocontrol agents on cotton growing in nematode-infested soil. **Anzeiger fuer Schaedlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v.68, p.12- 14. 1995.

Araujo, J. S. P. **Produção de bacteriocinas por estirpes brasileiras de *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith e perspectivas de sua utilização no controle biológico da murcha bacteriana.** (Tese de Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

Barker, K. R. Perspectives on planta and soil nematology. **Annual Review Phytopathology**, v.41, p.1- 25. 2003.

Barker, K. R., Koenning S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review Phytopathology**, v.36, p.165- 205. 1998.

Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729- 770. 1998.

Boneti, J. I. S., Ferraz, S. Modificação do método de Hussey e Baker para extração de ovos de *M. exigua* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, n.3, 1981, p.553. 1981.

Brown, S. M., Nordmeyer, D. Synergistic reduction in root galling by *Meloidogyne javanica* with *Pasteuria pentrans* and nematicides. **Revue Nematology**, v.8, p.285- 286. 1985.

Fahy, P. C., Persley, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**: Academic Press. 1983. 393 p.

Ferris, H., Venette, R. C., Lau, S. S. Population energetics of bacterial-feeding nematodes: carbon and nitrogen budgets. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.1183- 1194. 1997.

Habe, H. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas - RPCP - no controle do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* em tomateiro.** (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília - DF, 1997. 102 p.

Hasky-Günter, K., Hoffman-Hergarten, S., Sikora, R. A. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systemically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). **Fundamentals of Applied Nematology**, v.21, p.511- 517. 1998.

Jatala, P. Biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.24, p.453- 489. 1986.

Kado, C. I., Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969- 976. 1970.

Kempe, J., Sequeira, L. Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. **Plant Disease**, v.67, p.499- 503. 1983.

Kiraly, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest: Akademiai Kiadó. 1970. 509 p.

Kloepper, J. W., Rodriguez-Kabana, R., Mcinroy, J. A., Young, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant Soil**, v.139, p.75- 84. 1992.

Kloepper, J. W., Schroth, M. N. Relationship of in antibiosis of plant growth- promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v.71, n.10, p.1020- 1024. 1981.

Kloepper, J. W., Rodriguez-Kabana, R., Mcinroy, J. A., Collins, D. J. Analysis of populations and physical characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. **Plant and Soil**, v.136, p.95- 102. 1991.

Lelliott, R. A., Stead, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1987. 216 p.

Mariano, R. L. R., Barros, S. T., Souza, E. B., Holanda, V. T., Assis, S. M. P., Xavier, M. A., Michereff, S. J., Gomes, A. M. A. Controle Biológico de *Pseudomonas solanacearum* em tomateiro com *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, v.18, p.19 (res.). 1992a.

Mariano, R. L. R., Michereff, S. J., Holanda, V. T., Assis, S. M. P., Souza, E. B., Xavier, M. A. Controle Biológico de *Pseudomonas solanacearum* em tomateiro com *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Summa Phytopathologica**, v.18, p.19 (res.). 1992b.

Moura, A. B. **Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro.** Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 1996. 167 p.

Neves, W. S., Freitas, L. G., Romeiro, R. S., Silva, H. S. A. Controle de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* em tomateiro por bactérias endofíticas. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.102- 103. 2000.

Oostendorp, M., Sikora, R.A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nématologie**, v.12, p.77- 84. 1989.

Pouidel, D. D., Ferris, H., Klonsky, K., Horwath, W. R., Scow, K. M., et al. The sustainable farming system project in California's Sacramento Valley. **Outlook Agric.**, v.30, p.109- 116. 2001

Racke, J., Sikora., R. A. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, p.521- 526. 1992a.

Racke, J., Sikora, R. A. Influence of the plant health-promoting rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* and *Bacillus sphaericus* on *Globodera pallida* root infection of potato and subsequent plant growth. **Journal of Phytopathology**, v.134, p.198- 208. 1992b.

Reitz, M., Rudolph, K., Schröder, I., Hoffmann- Hergarten, S., Hallmann, J., Sikora, R. A. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3515- 3518. 2000.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas.** Viçosa: UFV. 2001. 279 p.

Sayre, R. M., Walter, D. E. Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.29, p.149- 166. 1991.

Shekhawat, G. S., Chakrabarti, S. K., Kishorre, V., Sunaina, V., Gadewar, A. V. Possibilities of biological management of potato bacterial wilt with strains of *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Pseudomonas*

fluorescens and actinomycetes. **ACIAR Proceedings**, v.45, p.327 - 330. 1994.

Siddiqui, Z. A., Mahmood, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, v.69, p.167- 179. 1999.

Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S. Resistance against the damping-off fungus *Rhizoctonia solani* systemically induced by the plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (IE- 6S+) and *P. fluorescens* (CHA0). **Journal Phytopathology**, v.150, p.500- 506. 2002a.

Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. **Journal Phytopathology**, v.150, p.469- 473. 2002b.

Sikora, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Med. Fac. Kandbouww. Rijksuniv. Gent**, v.53, p.867- 887. 1988.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal Phytopathology**, v.152, p.371- 375. 2004.

Stirling, G. R. **Biological Control of Plant Parasite Nematodes - Progress, Problems and Prospects**. Mekshom: Redwood Press. 1991. 282 p.

Trigalet, A., Frey, P., Trigalet-Demery, D. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: State of the art and understanding. In: Hayward, A. C., Hartman, G. L (eds.). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. **CAB International**, 1994. p.259p.

Wei, G., Kloepper, J. W., Tunzun, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, p.221- 224. 1996.

Weller, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v.26, p.379- 407. 1988.

Williams, S. T., Wellington, E. M. H. Actinomycetes. **Methods of soil analysis**, 1982. p.969- 987.

CONCLUSÕES GERAIS

Através dos testes bioquímicos realizados, verifica-se a diversidade fisiológica e versatilidade nutricional do isolado.

Bacillus cereus não teve ação antagônica à maioria dos patógenos testados.

O isolado de *Bacillus cereus* testado não promoveu o crescimento de plantas de tomateiro, porém foi capaz de aumentar a produtividade da cultura sob cultivo protegido.

A avaliação da sobrevivência de células de *B. cereus* na formulação proposta não foi efetiva em manter a viabilidade celular do isolado.

Pode-se verificar a indução de resistência em plantas de tomateiro quando desafiadas com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Bacillus cereus é compatível com a maioria dos pesticidas utilizados na cultura do tomateiro e adjuvantes utilizados em formulações comerciais.

Verifica-se a capacidade de utilização de certos antibióticos em estudos de dinâmica populacional do isolado.

O isolado não conteve a epidemia de requeima em campo, murcha bacteriana em infectário e nematóide das galhas em casa de vegetação.

De posse dos resultados, pode-se pensar na manipulação de parâmetros relacionados ao desenvolvimento do isolado, otimizando seu potencial como indutor de resistência.