

Introdução

O fungo toxigênico *Aspergillus flavus* pode colonizar grãos de milho no campo e durante o armazenamento, acarretando em perdas de qualidade e produção de micotoxinas; O uso de bactérias do solo como agentes de biocontrole, tem grande potencial devido a competição deste com o fungo.

Avaliou-se o efeito de bactérias do gênero *Bacillus* spp. sobre o crescimento *in vitro* de *A. flavus* e os parâmetros de dispersão, e a capacidade da bactéria em produzir iturrina A, e reduzir a produção de aflatoxina B1.

Material e Métodos

Foram utilizados dois isolados de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina B1, coletados em grãos de milho. Foram utilizados como agentes de biocontrole *Bacillus safensis* (RF69), *Bacillus amyloliquefaciens* (RP103) e estirpes de *Bacillus subtilis* (RP242) que foram previamente isoladas do sistema radicular de plantas de milho. Para a preparação do inóculo, isolados bacterianos foram cultivadas durante 24 horas, na concentração de 10^9 UFC ml⁻¹. Os fungos foram cultivados em agar extrato malte (MEA), a 25 °C durante 7 dias e as colônias foram lavadas com 10 ml de água peptonada (0,1%) para originar suspensões de esporos. Suspensões de esporos foram medidos na câmara de Neubauer e ajustadas para 10^6 ou 10^3 esporos mL⁻¹ por diluições em série.

Foram avaliados o diâmetro da colônia, a taxa de crescimento micelial; produção de conídios; Germinação e sobrevivência de conídios; índice de dominância em diferentes atividades de água e temperaturas; Produção de Iturrina A; Contagem e redução do crescimento fungico; Produção de Aflatoxina B1.

Resultados e Discussão

Tabela 1. Efeito *in vitro* da interação *Bacillus* spp. e *A. flavus*, na taxa de crescimento micelial, produção, germinação e sobrevivência de conídios, e produção de Iturrina A.

	Colony diameter (cm)	Mycelial growth rate (cm day ⁻¹)	Mycelial growth reduction (%)	Conidial production (log conidia per cm ² of mycelium)	Conidial germination inhibition (%)	Conidial survival (log UFC ml ⁻¹)	Iturin A (µg ml ⁻¹)
Control	8.2 ± 0.18 a	1.10 ± 0.02 a	0 a	5.80 ± 2.59 b	0 a	5.98 ± 2.50 a	-
<i>B. safensis</i> RF69	2.2 ± 0.44 b	0.20 ± 0.06 b	73.2 ± 5.33 b	5.07 ± 1.53 c	79 ± 0.9 b	5.00 ± 2.45 b	ND
<i>B. amyloliquefaciens</i> RP103	1.9 ± 0.23 b	0.12 ± 0.01 b	76.8 ± 0.31 b	5.16 ± 1.28 c	97 ± 0.8 b	4.87 ± 1.54 c	74.72 ± 7.75 b
<i>B. subtilis</i> RP242	1.8 ± 0.15 b	0.10 ± 0.01 b	78.2 ± 0.07 b	5.91 ± 1.98 a	100 ± 0.4 b	4.83 ± 2.32 c	143.52 ± 37.74 a

Todos os agentes de biocontrole bacterianas reduziram significativamente ($p \leq 0,05$) o crescimento micelial em meio MMEA, reduzindo a taxa de crescimento num intervalo entre 73 e 78%. Os isolados de *B. safensis* RP69 e *B. amyloliquefaciens* RP103 reduziram a produção de conídios, enquanto isolado *B. subtilis* RP242 aumentou significativamente a produção de conídios, estimulou a esporulação, quando comparado ao tratamento controle. A inibição da germinação de conídios também foi observado em todos os tratamentos bacterianas, variando entre 79 e 100%. A sobrevivência de conídios foi significativamente ($p < 0,05$) afetada por todos os agentes de biocontrole; isolados e isto resultou em contagens de fungos inferiores, apresentando uma maior eficácia na redução da sobrevivência de conídios após 24 horas de tratamento. Os isolados de *B. amyloliquefaciens* RP103 e *B. subtilis* RP242, foram capazes de produzir iturrina A (Tabela 1).

Tabela 2. Índice de dominância (Id) entre cepas bacterianas e *A. flavus* aflatoxigênico em diferentes atividades de água e temperaturas em meio MMEA.

Rhizobacterial isolates	a_w	Temperature			I_D
		20 °C	25 °C	30 °C	
<i>B. safensis</i> RF69	0.999	2/2	4/0	5/0	11/2
	0.982	2/2	2/2	4/0	8/4
	0.955	2/2	1/1	4/0	7/3
	0.937	1/1	1/1	4/0	6/2
	I_D	7/7	8/4	17/0	64/22
<i>B. amyloliquefaciens</i> RP103	0.999	5/0	5/0	5/0	15/0
	0.982	5/0	5/0	5/0	15/0
	0.955	5/0	5/0	5/0	15/0
	0.937	5/0	4/0	4/0	13/0
	I_D	20/0	19/0	19/0	116/0
<i>B. subtilis</i> RP242	0.999	5/0	5/0	5/0	15/0
	0.982	5/0	5/0	5/0	15/0
	0.955	5/0	5/0	5/0	15/0
	0.937	4/0	5/0	5/0	14/0
	I_D	19/0	20/0	20/0	118/0

O ID entre *A. flavus* e agentes de biocontrole bacterianos em meio MMEA. Dois padrões de dominância foram observados na interação entre bactérias e *A. flavus*. O primeiro padrão foi inibição fúngica à distância (5/0) como uma interação predominante entre *B. amyloliquefaciens* RP103 x *A. flavus* e *B. subtilis* RP242 x *A. flavus*, onde as bactérias mantiveram seu status de dominância após as variações ambientais. O segundo padrão foi uma diminuição de dominância de *B. safensis* RF69 no sentido de *A. flavus*, a fim de que a atividade e a temperatura da água foi reduzindo.

Tabela 3. Efeito do tratamento bacteriano em grãos de milho, na contagem fúngica de *A. flavus* e produção de aflatoxina B1.

	Fungal counts (log CFU g ⁻¹ maize)	Aflatoxin B1 (µg kg ⁻¹)	Aflatoxin B1 per CFU (µg CFU ⁻¹)
Control	8.67 ± 2.08 a	761 ± 123 a	87.73 a
<i>B. safensis</i> RF69	6.96 ± 2.64 b	339 ± 80 b	48.67 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> RP103	4.57 ± 1.91 d	41,5 ± 21 d	9.05 d
<i>B. subtilis</i> RP242	5.65 ± 1.96 c	216 ± 30 c	38.30 c

Na contagem de fungos, todos os isolados bacterianos foram capazes de crescer e reduzir significativamente ($p \leq 0,05$) as contagens fúngica em grão de milho em uma faixa entre 19% (*B. safensis* RF69) e 47% (*B. amyloliquefaciens* RP103). Também foram capazes de reduzir a produção de AFB1, em todos os tratamentos.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo mostraram características promissoras de *Bacillus* spp. para serem utilizados como agentes de biocontrole em *Aspergillus flavus* em sistemas agroecológicos de milho. Os isolados foram capazes de reduzir o crescimento de fungos e a capacidade de dispersão *in vitro* e em grãos de milho, bem como reduzir a produção AFB1 nas condições testadas. Os isolados *B. amyloliquefaciens*, RP103 e *B. subtilis*, RP242 foram capazes de manter o domínio na interação com *A. flavus*, mesmo em condições de temperatura e de estresse hídrico, caracterizando os isolados como agentes de biocontrole promissoras para *A. flavus*, podendo serem usados no milho no campo e durante o armazenamento.

Referências Bibliográficas

- Bluma, R.V. & Etcheverry, M.G. (2006). Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi*. *Pest Management Science*, 62, 242–251. .
 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2011). *Maximum tolerable limits for mycotoxins in foods* Resolution - RDC N° 7, February 18 of 2011. Available at: <http://www.anvisa.org.br>. Accessed in: 15.04.2013.