

Avaliação de estirpes de actinomicetos com potencial bioherbicida em sistemas agrícolas sustentáveis⁽¹⁾

Bárbara Ventura Ferreira⁽²⁾, Alexandre Ferreira da Silva⁽³⁾

⁽¹⁾ Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig. ⁽²⁾ Estudante do Curso de Agronomia da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. ⁽³⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Resumo - O manejo de plantas daninhas é crucial para a produção agrícola, mas métodos químicos tradicionais podem causar impactos negativos ao meio ambiente e à saúde humana. O controle biológico com metabólitos produzidos por Actinomyces (bactérias) surge como alternativa promissora e sustentável. Este estudo visa avaliar o efeito de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de planta bioindicadora (pepino, *Cucumis sativus*) e avaliar o potencial de metabólitos secundários produzidos sobre o crescimento da planta teste. Quatro meios de culturas foram testados. Posteriormente, o meio selecionado (M21) foi utilizado para avaliar o efeito dos metabólitos secundários de cinco estirpes de actinomicetos. O meio foi escolhido por promover o crescimento da planta indicadora (pepino) sem afetar a germinação das sementes. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Todos os meios de cultura contendo metabólitos produzidos pelas estirpes de Actinomyces apresentaram atividade herbicida, inibindo o crescimento do pepino em comparação com os controles. Os resultados indicam o potencial das Actinomyces como agentes de controle biológico de plantas daninhas. As estirpes selecionadas de Actinomyces apresentaram alta atividade herbicida, possibilitando pesquisas futuras em campo e o desenvolvimento de produtos biopesticidas mais eficientes e ecológicos.

Termos para indexação: controle biológico, Actinomyces, planta daninha, sustentabilidade, agricultura.

Evaluation of actinomycetes strains with bioherbicidal potential in sustainable agricultural systems

Abstract - Weed management is crucial for agricultural production, but traditional chemical methods can cause negative impacts on the environment and human health. Biological control with metabolites produced by Actinomyces (bacteria) emerges as a promising and sustainable alternative. This study aims to evaluate the effect of different culture media on the growth of a bioindicator plant (cucumber, *Cucumis sativus*) and to evaluate the potential of secondary metabolites produced on the growth of the test plant. Four culture media were tested. Subsequently, the selected medium (M21) was used to evaluate the effect of secondary metabolites of five actinomycete strains. The medium

was chosen because it promotes the growth of the indicator plant (cucumber) without affecting seed germination. The statistical design used was completely randomized, with six replicates. All culture media containing metabolites produced by the actinomycete strains showed herbicidal activity, inhibiting the growth of cucumber compared to the controls. The results indicate the potential of Actinomycetone as biological weed control agents. The selected Actinomycetone strains showed high herbicidal activity, enabling future field research and the development of more efficient and environmentally friendly biopesticide products.

Index terms: biological control, Actinomycetone, weeds, sustainability, agriculture.

Introdução

O manejo de plantas daninhas pode ser realizado pelos métodos de controle preventivo, mecânico, físico, químico e biológico (Silva et al., 2011; Morais et al., 2021). O controle químico é o mais utilizado. No entanto, o uso inadequado dessa estratégia de manejo vem ocasionando impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana (Deuber; Novo, 2006). Diante desse cenário, é muito importante a utilização de métodos de controle que ocasionam menor impacto ao ambiente e à saúde humana. Dentro desse contexto, o controle biológico se destaca como uma interessante alternativa de controle. Pesquisas sobre essa temática começam a se tornar mais comuns na área de matologia (Poveda et al., 2020).

O controle de plantas daninhas com Actinomycetona (por exemplo, actinobactérias) (Oren; Garrity, 2021) é uma abordagem promissora e sustentável que tem atraído crescente interesse na agricultura moderna (Malik et al., 2021). Esses microrganismos são conhecidos por sua capacidade de produzir grande diversidade de metabólitos secundários bioativos, incluindo compostos antimicrobianos e substâncias que inibem o crescimento de plantas (Wellington; Toth, 1992; Taguchi et al., 1993). Essas bactérias são encontradas naturalmente no solo e na região da rizosfera das plantas. São classificadas como gram-positivas e de ampla diversidade genética (Gottlieb; Siminoff, 1952). Por essas características, esse grupo de microrganismos tem atraído interesse crescente como agentes de controle biológico.

No entanto, para avaliar o potencial de ação dos metabólitos secundários, é fundamental validar metodologia de seleção para os microrganismos que propicie a adequada avaliação do potencial de ação herbicida dos metabólitos produzidos por esses microrganismos.

O objetivo deste trabalho foi selecionar meio de cultura que permita o adequado crescimento das estirpes de actinomicetos selecionadas, que não afetem negativamente o crescimento das plantas-testes.

Material e métodos

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. As cepas utilizadas foram selecionadas no Banco de

Germoplasma Microbiano e reativadas em placas de Petri, com meio próprio para actinomiceto, de acordo com Atlas (2010), composto por asparagina 1 g/L; Glicerol 10 mL/L; KH₂PO₄ 1 g/L; Solução de micronutrientes para actinomicetos 1 mL/L; Ágar bacteriológico 18 g/L. Em seguida, foi verificada a pureza das estirpes e preservação em estoque para trabalhos posteriores. Após a reativação e avaliação da pureza das estirpes, foi iniciado um bioensaio para avaliação de suscetibilidade de pepino (*Cucurbit sativa*) à ação dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias. Para isso, foram estabelecidos dois ensaios.

O primeiro ensaio consistiu na seleção de um meio de cultura que não afetasse a germinação e o desenvolvimento da planta indicadora. Para isso, foram testados quatro meios de cultura líquidos: M01 (Glicerol 10 g/L; Caseína 0,3 g/L; KNO₃ 2 g/L; K₂PO₄ 2 g/L; NaCl 2 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,05 g/L; CaCO₃ 0,02 g/L; FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L; e pH=7,8), M03 (Pepitona de soja 10 g/L; Glucose 10 g/L; Amido solúvel 20 g/L; CaCO₃ 3 g/L), M20 (Glicerol 10 g/L; Caseína 0,3 g/L; KNO₃ 3 g/L; K₂PO₄ 2 g/L; NaCl 2 g/L; MgSO₄.7H₂O 0,05 g/L; CaCO₃ 0,02 g/L; FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L; e pH= 7_+ 1) e M21 (Amido 10 g/L; Caseína em pó 1 g/L; NaCl 5g; e pH=7.2_+ 0.2). Eles foram comparados com uma testemunha (água). Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 40 repetições por tratamento.

Os poços das microplacas estéreis e com tampa, da marca CORNING, com 24 poços para cultivo de células na cor transparente, com volume de 3,4 mL e de fundo plano, foram preenchidos com algodão esterilizado e umedecidos com 1,3 mL dos diferentes sobrenadantes dos meios de cultura, com duas sementes em cada poço. As placas foram tampadas e levadas para câmara de crescimento durante 5 dias em temperatura média de 28 °C e fotoperíodo de 12h/12h. O teste foi realizado seguindo a metodologia proposta por Leal (2019). Após esse período, foi avaliada a diferença do número de sementes germinadas nos diferentes tratamentos com os meios de cultura, utilizando o teste de Tukey a 5%.

Após a definição do meio de cultura, foi realizado o teste para verificar o efeito de metabólitos secundários produzidos por cinco actinomicetos (A115, A346, A363, A404 e A432). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 16 repetições por tratamento.

Em cada placa com actinobactéria, foi escolhida uma colônia isolada, raspada e homogeneizada em solução salina em um eppendorf, agitado no vortex e transferido para erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido, que foram autoclavados e resfriados. Posteriormente, foram colocados sob agitação por 10 dias a 100.2 rpm em incubadora com temperatura igual a 28 °C. As placas com poços foram higienizadas por imersão em solução de água + detergente + hipoclorito de sódio, por 30 minutos, enxaguadas três vezes em água deionizada e levadas ao fluxo para secarem na luz UV, mesmo processo da fase inicial. Os tratamentos testados foram água e meio de cultura M19 (Manitol 20 g/L; Peptona bac. 20 g/L e pH=7,5), como controles, e meio inoculado com as bactérias. Cada poço continha com duas sementes, sendo 16 repetições por tratamento, totalizando 112 sementes nesse teste.

Os poços foram preenchidos com algodão esterilizado e umedecidos com 1,3 mL de meio M19 e do sobrenadante das frações dos meios inoculados com bactérias. O sobrenadante foi obtido após centrifugação por 10 min a 8.000 rpm (centrífuga da marca HETTICH Zentrifugen Universal 320R 9000RPM), em tubos falcon de 50 mL, e filtragem com suporte de filtração autoclavável (diâmetro de 25 mm) para membrana millipore com poro de 22 mm de diâmetro.

Após montagem da placa, seguindo o mesmo processo citado anteriormente, realizou-se avaliação qualitativa, comparação visual com a testemunha, segundo os critérios apresentados na

Tabela 1. Nessa primeira qualificação, foram levados em consideração os níveis de desenvolvimento das plântulas de pepino nos poços.

Os estágios foram classificados de acordo com o desenvolvimento radicular e a emissão de folhas. Com isso, notas foram aplicadas como peso para diferenciação. Essa análise foi feita para selecionar o melhor meio de cultura de acordo com o desenvolvimento das plântulas de pepino dentro das 96 repetições (entre testemunhas e meios), com duas sementes em cada poço, totalizando 192 sementes.

Tabela 1. Critérios de avaliação qualitativa da germinação das sementes de pepino (*Cucumbersativa*), 5 dias após a incubação nas placas com poços de cultivo.

Critério	Peso
Emissão de folha e sistema radicular	1,0
Apenas emissão de raízes grossas	0,7
Apenas emissão de raízes finas	0,5
Não germinou	0,0

Os dados obtidos foram analisados conforme a sua normalidade e, em caso de significância, foram submetidos ao teste de Tukey a 5%.

Resultados e discussão

Ao analisar o efeito qualitativo no número de sementes germinadas, total de 181, em função do meio de cultura, pôde-se observar que o M21 foi o que apresentou o comportamento mais próximo à testemunha (Tabela 2). Acredita-se que os demais meios de cultura podem ter afetado o crescimento, uma vez que apresentam cloreto de sódio em sua composição e acréscimo de solução salina com o macerado das bactérias. O efeito, principalmente da salinização, pôde ser constatado visualmente durante a avaliação das sementes, o seu crescimento radicular foi prejudicado. Dessa forma, optou-se pela utilização do M21 para avaliar o potencial fitotóxico dos compostos metabólicos produzidos pelas bactérias.

Tabela 2. Comparação qualitativa da germinação das sementes de pepino (*Cucumbersativa*) em função dos meios de cultura utilizados.

Tratamentos	Sementes germinadas	Médias
Meio M03	34	0,85 a
Meio M01	38	1,03 ab
Meio M20	39	1,14 b
Meio M21	38	1,49 c
Testemunha	32	1,89 d

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Após a seleção do meio de cultura, foi realizado o ensaio para avaliar o efeito dos actinomicetos sobre germinação e desenvolvimentos das plantas. Nesse ensaio, foram utilizados dois controles (água e o meio M21). Os demais tratamentos consistiram do M21 associado ao metabólito produzido pelas bactérias testadas. Nessa avaliação, foram estabelecidos outros parâmetros com notas (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios de avaliação qualitativa da germinação das sementes de pepino (*Cucumber sativa*), 5 dias após a incubação com os meios inoculados.

Critério	Peso
Germinação vegetativa (sem inibição)	0
Efeito leve de inibição da germinação	1
Efeito leve a moderado de inibição da germinação	2
Efeito moderado de inibição da germinação	3
Efeito forte de inibição da germinação	4
Morte e/ou necrose vegetativa	5

Os dados obtidos foram analisados conforme a sua normalidade e, em caso de significância, foram submetidos ao teste de Tukey a 5%.

Foi possível observar que os metabólitos produzidos pelas estirpes selecionadas afetaram o crescimento da planta indicadora (Figura 1).



Figura 1. Comparação do desenvolvimento de sementes de pepino (*Cucumber sativa*) em resposta aos diferentes tratamentos com metabólitos obtidos de diferentes estirpes de actinomicetos.

Algumas espécies de actinomicetos têm a capacidade de produzir compostos antimicrobianos, como antibióticos e metabólitos secundários, que podem inibir o crescimento de plantas. Esses compostos podem interferir com processos fisiológicos essenciais das plantas, como a germinação de sementes, o crescimento radicular e a fotossíntese.

Ao analisar o efeito dos metabólitos, observou-se que todos apresentaram comportamento similar entre si e diferiram dos controles (Tabela 4).

Tabela 4. Inibição da germinação de sementes de pepino (*Cucurbita sativa*) em função dos tratamentos com metabólitos produzidos por cinco estirpes de Actinomicetes, conforme critério estabelecido, 5 dias após incubação.

Tratamentos	Médias
1) Água	0,00 a
2) Meio M21	6,25 a
3) Meio M21 + 346	82,63 b
4) Meio M21 + 404	82,13 b
5) Meio M21 + 363	84,38 b
6) Meio M21 + 432	90,63 b
7) Meio M21 + A115	95,81 b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Até o momento, obtiveram-se resultados significativos, mas novos ajustes metodológicos estão sendo realizados, com o objetivo de se estabelecer uma metodologia que propicie avaliar adequadamente o efeito dos metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos no crescimento das plantas. Após essa adequação de metodologia em laboratório, ensaios serão programados para a realização de screening dos actinomicetos presentes no Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que metabólitos obtidos de actinomicetos são promissores para o controle de plantas daninhas. A seleção do meio de cultura M21 foi crucial, pois apresentou comportamento mais próximo ao da testemunha, minimizando os efeitos negativos sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas indicadoras. Observou-se que os metabólitos produzidos pelas estirpes de actinomicetos testados exerceram um efeito inibitório significativo no crescimento das sementes de pepino (*Cucurbita sativa*), evidenciando seu potencial fitotóxico.

Embora os resultados sejam promissores, novos ajustes metodológicos são necessários para aperfeiçoar a avaliação do impacto dos metabólitos secundários no desenvolvimento dessas e outras plantas, incluindo as daninhas. Este estudo contribui para o avanço das pesquisas na área de controle biológico, indicando que os metabólitos produzidos por actinomicetos podem ser uma alternativa sustentável e eficaz ao controle químico, reduzindo os impactos negativos no meio ambiente.

Referências

ATLAS, R. M. **Handbook of microbiological media**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>.

DEUBER, R.; NOVO, M. do C. de S. S. Nodulação e desenvolvimento de plantas de soja iac-19 com aplicação dos herbicidas diclosulam e flumetsulam. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 5, n. 2, p. 57-63, 2006. DOI: <https://doi.org/10.7824/rbh.v5i2.44>.

GOTTLIEB, D.; SIMINOFF, P. The production and role of antibiotics in the soil, II- Chloromycetin. **Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 91-97, 1952.

LEAL, V. **Prospecção de microrganismos com potencial bioherbicida no controle de plantas daninhas na agricultura**. 2019. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro Universitário de Sete Lagoas-UNIFEMM, Sete Lagoas, 2019.

MALIK, M. T.; REHMAN, A. U.; NAQVI, S. A. H.; HASNAIN, A.; UMAR, U. U. D.; AZEEM, H.; SHAHID, M.; UMAIR, M. A critical review of research on exploitation of microbial antagonists for the control of bacterial diseases in crop. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 217-232, 2021. DOI: <http://doi.org/10.33866/phytopathol.033.01.0669>.

MORAIS, C. C. S.; BARROS, G. B. de S.; GENARI, D. A.; PALIN, D.; MENEGAZZO, R. F.; GAZIM, Z. C.; LOPES, A. D. Allelopathic potential of the aqueous extract of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on sourgrass seeds germination. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e36010715317, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.15317>.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary of Microbiology**, v. 71, n. 10, 5056, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: Trichoderma, mycorrhizal and endophytic fungi. **Review Frontiers in Microbiology**, v. 11, article 992, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>.

SILVA, M. C. de C.; BRAUN, H.; COELHO, F. S. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da batata. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 60-67, 2011.

TAGUCHI, S.; KIKUCHI, H.; SUZUKI, M.; KOJIMA, S.; TERABE, M.; MIURA, K.; NAKASE, T.; MOMOSE, H. Streptomyces subtilisin inhibitor-like proteins are distributed widely in streptomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4338-4341, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4338-4341.1993>.

WELLINGTON, E. M. H.; TOTH, I. **Course of actinomycetes ecology**. Rio de Janeiro: Embrapa-CNPAB, 1992. Mimeografado.