

Manual prático para análise do potencial antagonista microbiano (Teste de confronto ou antagonismo)

*Ronney Fernandes Chagas
Patrícia Thieme Onofri Saiki*

*Coordenação de Biologia
Departamento II
IFG – Câmpus Goiânia*

SUMÁRIO

1- Referencial teórico

1.1 - Pragas na agricultura e uso de agrotóxicos	3
1.2 - Controle biológico.....	3
1.3 - Teste de confronto ou antagonismo	4

2- Método do duplo-cultivo

2.1 - Materiais	6
2.2 - Procedimentos	6

3- Referências bibliográficas

	8
--	---

1- REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 – Pragas na agricultura e uso de agrotóxicos

As pragas agrícolas representam uma ameaça constante e significativa para a produção de alimentos em todo o mundo. Insetos, ácaros, nematoides, fungos, bactérias e plantas daninhas competem diretamente com as culturas, causando perdas de rendimento que podem chegar a 100% em casos graves, comprometendo a segurança alimentar e a economia do setor. A necessidade de proteger as lavouras contra esses organismos levou a um consumo exagerado e muitas vezes indiscriminado de produtos químicos sintéticos (agrotóxicos). Embora eficientes no curto prazo, a dependência crescente desses insumos cria um ciclo vicioso, o uso constante seleciona pragas mais resistentes, exigindo doses maiores ou a aplicação de produtos ainda mais potentes (IBAMA, 2017).

O uso intensivo de agrotóxicos traz consigo um grave custo ambiental e de saúde pública, culminando em uma poluição de grande escala. Esses produtos, muitas vezes projetados para serem de amplo espectro, não atingem apenas o alvo, mas também organismos benéficos, como polinizadores, inimigos naturais das pragas e outros membros da biodiversidade essencial. Além disso, o escoamento superficial destes produtos contamina rios, lagos e oceanos, enquanto a lixiviação polui as águas subterrâneas, prejudicando ecossistemas aquáticos e comprometendo o abastecimento humano. Adicionalmente, a deriva da pulverização e os resíduos nos solos e alimentos expõem trabalhadores rurais e consumidores a substâncias potencialmente tóxicas, com implicações sérias para a saúde a longo prazo (IBAMA, 2017).

1.2 – Controle biológico

Neste cenário de uso desenfreado de agrotóxicos, a adoção de agentes biológicos em processos de controle de pragas surge como uma alternativa crucial para um manejo mais limpo e sustentável.

O controle biológico utiliza seres vivos, como predadores, parasitoides, patógenos e competidores naturais das pragas ou seus bioprodutos (toxinas, enzimas, metabólitos secundários variados) para manter as populações de pragas em níveis aceitáveis (FAO,

2020). Essa abordagem não apenas reduz a dependência de químicos e a poluição associada, mas também é específica para a praga, preservando a fauna benéfica e a biodiversidade do agroecossistema.

A integração desses agentes em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) não só garante a produção de alimentos mais seguros, mas também promove a saúde do solo e a sustentabilidade a longo prazo das práticas agrícolas, representando um avanço fundamental para o futuro da agricultura (ABCbio, 2018).

1.3 – Teste de confronto ou antagonismo

Os testes de confronto ou antagonismo são etapas laboratoriais cruciais para a triagem inicial e identificação de microrganismos com potencial de uso como agentes de controle biológico.

O princípio básico desses testes reside em observar a capacidade do organismo em estudo de inibir o crescimento de um patógeno-alvo de interesse agrônômico. O método mais comum é o de pareamento em placa ou método do duplo-cultivo, onde o potencial biocontrolador e o patógeno são semeados em lados opostos (equidistantes) de um meio de cultura sólido, sendo comumente usado o meio Ágar Dextrose Batata (BDA) (DENNIS e WEBSTER, 1971).

A observação da formação de um halo de inibição entre as duas colônias ou o crescimento do antagonista sobre o patógeno (micoparasitismo) indica a produção e secreção de compostos antifúngicos ou antibacterianos relacionados com mecanismos de antagonismo (Figura 1).

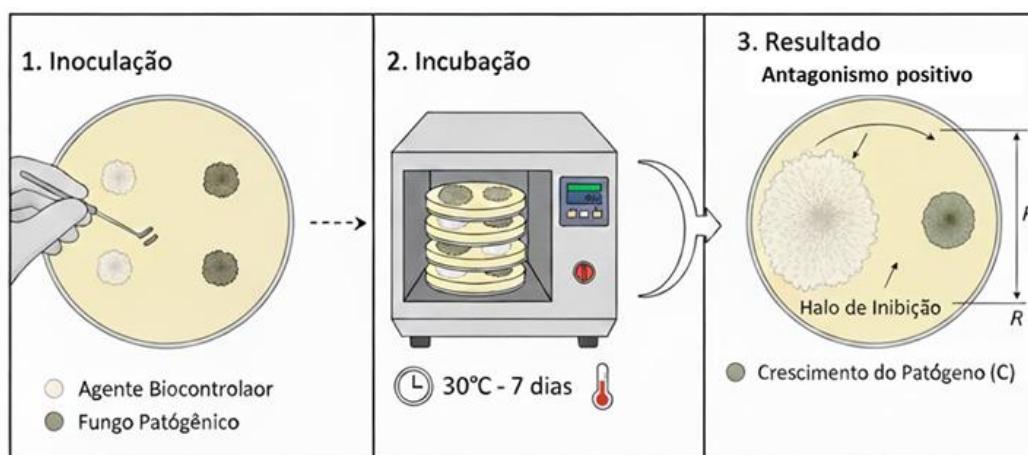
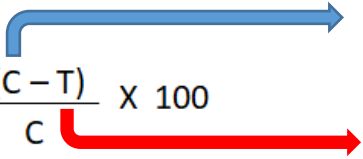


Figura 1 – Etapas procedimentais do teste de antagonismo. Fonte: imagem gerada por inteligência artificial (<https://gemini.google.com/app>).

Para análise quantitativa da eficácia de biocontrole, frequentemente, utiliza-se o cálculo percentual de inibição do crescimento radial (PIR) do patógeno. O cálculo do PIR é a forma padrão de quantificar a eficácia de um agente biocontrolador no teste de confronto (duplo-cultivo). A inibição é determinada comparando-se o crescimento do patógeno na presença do antagonista, com o crescimento do patógeno em uma placa de controle, onde ele cresce sozinho.

Para obtenção do percentual de inibição do crescimento radial - PIR (%) - utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{PIR (\%)} = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$


(C) - diâmetro médio da colônia do patógeno na condição controle (patógeno sozinho, sem o possível biocontrolador).

(T) - diâmetro médio da colônia do patógeno na condição de tratamento (patógeno em confronto com o possível agente biocontrolador).

A análise aprofundada dos resultados dos testes de antagonismo permite determinar possíveis mecanismos de ação primário do potencial biocontrolador (MENGHINI *et al.*, 2016).

Se o microrganismo testado produzir um halo de inibição sem contato físico, isso sugere um forte mecanismo de antibiose (liberação de metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos voláteis ou não voláteis). Caso o antagonista cresça diretamente sobre o patógeno, o mecanismo de micoparasitismo (no caso de fungos) ou predação (no caso de bactérias) é o provável mecanismos de ação. Outros mecanismos ainda incluem a competição por nutrientes e espaço, especialmente em meios com recursos limitados.

A seleção de isolados que demonstram alta taxa de inibição e diferentes mecanismos de ação é fundamental para etapas posteriores envolvendo testes *in vivo*, identificação e isolamento das biomoléculas com potencial antagonista, visando a formulação de um produto biológico robusto e eficiente na prática.

Neste contexto, o objetivo desse material é trazer uma metodologia padronizada de avaliação do potencial biocontrolador de diversos microrganismos.

2- MÉTODO DO DUPLO-CULTIVO

2.1.1 – Materiais

- ✓ Suspensão de microrganismos (patógeno e biocontrolador) padronizadas a 10^8 UFC.mL⁻¹.
- ✓ Pinça estéril;
- ✓ Estilete estéril;
- ✓ Régua ou paquímetro;
- ✓ Canudos esterilizados e cortados (aproximadamente 1 cm);
- ✓ Placas contendo o meio Ágar Dextrose Batata (BDA).

2.1.2 – Procedimentos

- ✓ Realizar previamente o cultivo de cada uma das cepas (patógenos e biocontroles) de forma isolada em meio BDA.
- ✓ Após crescimento dos microrganismos, escolher uma região mais centralizada da cultura e com o estilete realizar um corte 1 cm x 1 cm da região do meio, observando se a colônia de microrganismos está presente em toda a extensão do meio cortado.
- ✓ Para análise do diâmetro da colônia do patógeno na condição controle, adicionar o fragmento cortado anteriormente, na superfície de outra placa contendo o meio BDA, buscando adicionar o material no centro da placa.
- ✓ Para análise de antagonismo, em uma placa contendo o meio BDA, adicione em uma extremidade o material cortado da cultura prévia do patógeno e na outra extremidade equidistante, adicione o material cortado referentes a cultura prévia do possível biocontrole (Figura 2).

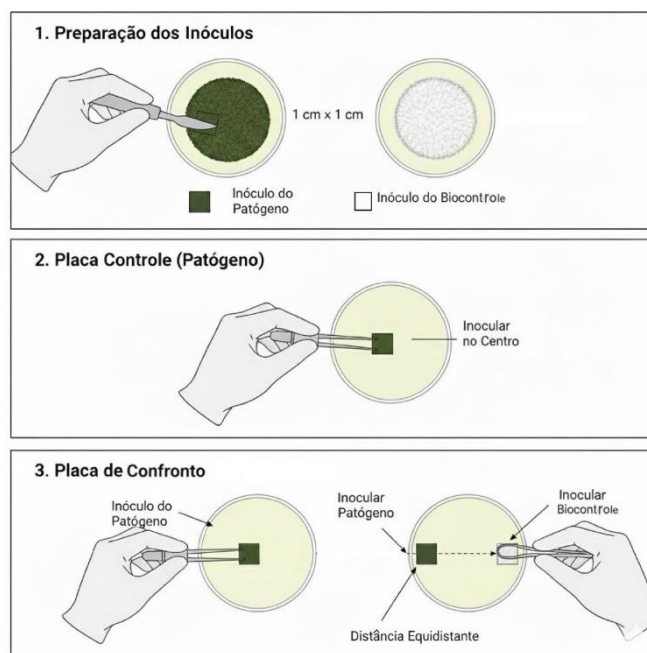


Figura 2 – Etapas procedimentais para teste de antagonismo. Fonte: imagem gerada por inteligência artificial (<https://gemini.google.com/app>).

- ✓ Incubar a 30°C por 7 dias as placas controle e as placas do teste.
- ✓ Na placa referente ao controle (C), medir o diâmetro da colônia do patógeno.
- ✓ Na placa referente ao teste (T), medir o diâmetro do halo de inibição (zona em torno do fitopatógeno onde se evidencia um impedimento de crescimento).
- ✓ Calcular o percentual de inibição do crescimento radial (PIR).

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO (ABCBio). **Panorama e Desafios do Controle Biológico no Brasil**. In: CÂMARAS SETORIAIS TEMÁTICAS. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. 33 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/panorama-e-desafios-do-controle-biologico-no-brasil-77.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2025.

DENNIS, C., WEBSTER, J. **Antagonism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. in soil and its possible mechanism**. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 25-39, ago. 1971.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura). **Guia para o controle biológico clássico de pragas de insetos em florestas plantadas e naturais**. Roma: FAO, 2020. 102 p. Disponível em: <https://www.fao.org/sao-tome-e-principe/noticias/detail-events/en/c/1189896/>. Acesso em: 14 dez. 2025.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos no Ibama**. [S. l.]: Ministério do Meio Ambiente, 2017. 17 p. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/servicos/avaliacao-e-destinacao/quimicos-e-biologicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola/arquivos/2017/2017-07-25-avaliacao_risco_ambiental_agrotoxicos_ibama_2012-ARA.pdf. Acesso em: 14 dez. 2025.

MENGHINI, V. R., LOPES, E. B. C., SANTOS, S. C. **Avaliação *in vitro* da atividade antagônica de isolados de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* sobre *Sclerotinia sclerotiorum***. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável, Itapeva, v. 6, n. 3, p. 55-63, 2016.

ANOTAÇÕES