

Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos

Metodos usados no ...

2007

LV-2008.00018



CNPMA-7500-2



Embrapa



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Métodos usados no Biocontrole de Fitopatógenos

Editores:

Rosa Maria Valdebenito Sanhueza
Itamar Soares de Melo

Bento Gonçalves, RS
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515

Caixa Postal 130

Fone: (0xx)54 3455 8000

Fax: (0xx)54 3451 2792

<http://www.cnpuv.embrapa.br>

sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Lucas da Ressurreição Garrido*

Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*

Membros: *Luiz Antenor Rizzon, Kátia Midori Hiwatashi, Osmar Nickel,*

Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Normalização bibliográfica: *Kátia Midori Hiwatashi*

Elaboração da capa: *Luciana Elena Mendonça Prado*

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Uva e Vinho

Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos/Editado por Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo. – Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007.

141 p.

ISBN 978-85-89921-05-3

1. Doença de planta. 2. Antagonismo. 3. Microrganismo. I. Valdebenito Sanhueza, Rosa Maria, ed. II. Melo, Itamar Soares de, ed.

CDD 579 (21. Ed.)

© Embrapa, 2007

Apresentação

Em consonância com a missão institucional da Embrapa Uva e Vinho, desde longa data vêm sendo desenvolvidas ações de pesquisa e desenvolvimento que têm gerado importantes resultados no tocante ao componente ambiental. E isto ocorre porque é comprovada a necessidade de buscar-se o desenvolvimento sustentado do espaço rural, tendo-se em vista as exigências de mercado, dos produtores e dos órgãos ambientais em reduzir-se o impacto ambiental da atividade produtiva.

É neste contexto que o controle biológico se insere. Ao maximizar o uso de organismos naturais no manejo de pragas e doenças, esta tecnologia contribui decisivamente para que a produção se dê com reduzido impacto, em benefício da almejada sustentabilidade. Esta publicação é resultante de estudos de pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho e de outras Unidades da Embrapa, além de essenciais parceiros, os quais, em parceria, têm contribuído para a melhoria do conhecimento sobre esta importante área.

Temos certeza que as informações aqui divulgadas servirão para o maior conhecimento e uso do controle biológico, bem como de estímulo e suporte para novas ações de pesquisa que resultem em tecnologias ambientalmente limpas e tecnicamente viáveis.

Alexandre Hoffmann
Chefe-Geral
Embrapa Uva e Vinho

Sumário

Isolamento de antagonistas a patógenos que colonizam ferimentos de plantas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	9
Obtenção de epífitas de frutos e seleção de antagonistas no controle de podridões de pós-colheita <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	13
Isolamento de colonizadores de clamidosporos de <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	17
Isolamento de bactérias do rizoplano e endorizosfera e seu efeito na colonização de raízes e na promoção do crescimento de plantas <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	21
Isolamento de antagonistas para controle de doenças vasculares <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	27
Avaliação do efeito protetor e curativo de antagonistas a patógenos que colonizam folhas <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, Margareth Zamboni-Pinotti e Ana Elisa Silveira Perez</i>	31
Multiplicação de <i>Clonostachys rosea</i> <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Gilberto Dall Onder</i>	35
Seleção de fungos endofíticos em fruteiras e flores <i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Margareth Zamboni-Pinotti</i> ...	39
Isolamento seletivo de bactérias ativas para nucleação de gelo <i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	43

Isolamento de fungos micorrízicos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	45
Isolamento seletivo de <i>Bacillus</i>	
<i>Wagner Bettiol</i>	49
Obtenção de mutantes e competitividade de isolados de bactérias resistentes a antibióticos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	53
Obtenção de mutantes de <i>Trichoderma</i> spp. resistentes a fungicidas	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	55
Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	59
Identificação de bactérias pelo sequenciamento de genes 16S ribossômico (16S rDNA)	
<i>Fernando Dini Andreote</i>	67
Identificação e diferenciação de linhagens de leveduras antagônicas a fitopatógenos utilizando sondas convencionais como indicadores na reação de polimerização em cadeia	
<i>Luis Fernando Revers e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	75
Produção de sideróforos por rizobactérias	
<i>Itamar Soares de Melo e Rosa Maria Valdebenito Sanhueza</i>	79
Produção de antibióticos por microrganismos	
<i>Rosa T. S. Frighetto e Itamar Soares de Melo</i>	83

Produção de bactérias para uso no controle biológico	
<i>Deise Maria Fontana Capalbo</i>	97
Encapsulamento de microrganismos	
<i>Rosa Maria Valdebenito Sanhueza e Itamar Soares de Melo</i>	103
Roteiro para formulação experimental pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP)	
<i>Cláudia Medugno</i>	109
Isolamento de actinomicetos visando ao controle biológico de fitopatógenos	
<i>Joelma Marcon, Jose Antonio da Silva e Maria Carolina Quecine</i> ...	117
Avaliação <i>in vitro</i> da colonização de raízes por rizobactérias	
<i>Brígida P. Vilar Queiroz e Itamar Soares de Melo</i>	121
Seleção de rizobactérias capazes de formarem biofilmes	
<i>Francisco Eduardo de C. Costa e Itamar Soares de Melo</i>	125
Avaliação ecotoxicológica de microrganismos em organismos não-alvo, organismos aquáticos e mamíferos	
<i>Vera Lúcia de Castro e Cláudio Jonsson</i>	129
Apêndice	
Meios de Cultura e Soluções	137

Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos

Itamar Soares de Melo¹

Márcia Maria Parma²

As membranas de bactérias contêm lipídios como principal componente. A composição dos ácidos graxos desses lipídios é característica das diferentes taxas, e por isso podem ser usados como biomarcadores. A recuperação quantitativa e análise dos ácidos graxos podem ser usadas para definir os membros de uma comunidade microbiana.

Ácidos graxos que contenham de 9 a 20 carbonos na cadeia têm sido utilizados para caracterizar gêneros e espécies de bactérias, especialmente aqueles que seriam categorizados como organismos Gram negativos não-fermentativos. Com o advento das colunas capilares de sílica fundida tem se tornado prático usar cromatografia gasosa e ésteres metílicos de ácidos graxos de células inteiras para identificar uma gama de bactérias.

Um sistema de software (Microbial ID, Inc., Newark, Dell) e hardware (Hewlett-Packard Co.) combinados e identificados como Sistema de Identificação Microbiológica (MIS) tem sido disponível comercialmente. O MIS é baseado em ácidos graxos que têm cadeias de 9 a 20 carbonos retas, ramificadas, saturadas ou insaturadas e que contenham grupos hidróxi e ciclopropano. O sistema usa cromatografia gasosa de alta-resolução para determinar a composição de ácidos graxos de isolados bacterianos de interesse e, então, faz busca contra bibliotecas de composição conhecida. As bibliotecas incluem aquelas disponíveis do "Microbial ID" e também aquelas geradas pelo usuário ou outros pesquisadores.

Hoje em dia mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados têm sido encontrados em bactérias analisadas pelo MIS.

¹ Eng. Agrôn., Doutor, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

² Química, Laboratório de Microbiologia Ambiental, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Nomenclatura dos Ácidos Graxos

A seguir será apresentada uma exemplificação da nomenclatura de um ácido graxo.

A cadeia do ácido graxo abaixo observada (Figura 1) tem 18 carbonos e seria escrito 18:0 se ela não tivesse nenhum dos grupos funcionais apresentados de (a) a (f). Para nomear um composto como sendo 19:0 ISO este deveria conter os 18 carbonos na cadeia linear e ainda apresentar um grupo metílico (a) do segundo ao último carbono, enquanto que para ser 19:0 ANTEISO deveria conter o grupo metílico (b) do terceiro ao último carbono. A ligação dupla (c) tem ambos hidrogênios posicionados do mesmo lado, e é escrito como sendo 18:1 cis 11, desde que a única ligação dupla desta cadeia – indicada na nomenclatura como :1 – esteja depois do décimo primeiro carbono. Se os hidrogênios estiverem em lados opostos, o composto seria escrito 18:1 trans 11. O ciclopropano contido entre os carbonos 9 e 10 desta cadeia de 18 carbonos (d) deve ser escrito como 19:0 CICLO 9-10. O grupo hidroxila adicionado ao terceiro carbono é descrito como 18:0 3OH (e), enquanto o grupo hidroxila no segundo carbono (f) é descrito como 18:0 2OH.

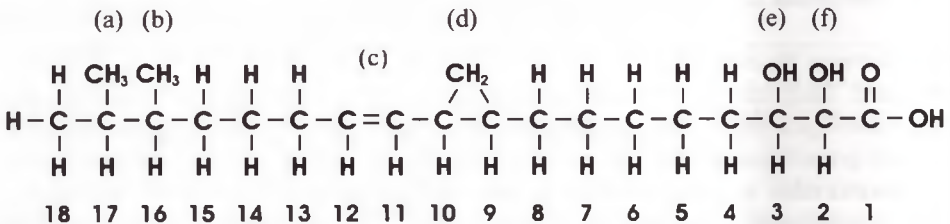


Fig. 1. Cadeia de um ácido graxo.

Objetivo

Identificação rápida de bactérias aeróbicas por Cromatografia Gasosa fazendo uso de ácidos graxos de suas membrana.

Protocolo

Etapa I – Cultivo das Bactérias

Cultivar as bactérias pelo método das estrias cruzadas, em meio TSBA de marca BBL (Trypticase Soy Broth Agar) que consiste de 30 g de Trypticase Soy Broth BBL e 15 g de Agar BBL em 1 litro de água destilada.

Nota: A marca BBL é recomendada para uso tendo em vista que a Cromatografia é uma análise comparativa. As bibliotecas adquiridas para comparação possuem certos requisitos obrigatórios e um deles é o uso de meios de marcas específicas. A utilização de meios de cultura de outras marcas pode não apresentar resultados equivalentes.

As bactérias aeróbicas que não crescerem neste meio podem ser inicialmente cultivadas em meios mais apropriados para seu crescimento, mas para a identificação em Cromatografia Gasosa (MIS) é necessário que estas bactérias sejam posteriormente repicadas em meio TSBA.

Nota: Após repicagem os isolados deverão ser incubados sob a condição de temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e por um tempo de 24 ± 2 horas para então dar início às etapas de extração.

Etapa II – Extração dos Ácidos Graxos

1. 40 mg de massa de células são transferidos para tubos de cultura de 13 x 100 mm.
2. Amostras são, primeiramente, saponificadas com $1,0 \pm 0,1$ mL do reagente de saponificação (45 g de hidróxido de sódio, 150 mL de metanol e 150 mL de água destilada e deionizada), agitadas com "vortex" por 10 segundos, aquecidas a 100°C por 5 minutos em banho-maria, agitadas novamente por 10 segundos, re-aquecidas a 100°C por mais 25 minutos e, por último, colocadas em banho de água para resfriarem até atingir a temperatura ambiente.
3. As amostras passam para o segundo passo, o de metilação dos ácidos celulares, que é realizado com a adição de $2,0 \pm 0,1$ mL do reagente de metilação (325 mL de HCl 6.0 N e 275 mL de metanol), agitação por 10 segundos, aquecimento a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 ± 1 minutos e resfriamento em banho de água para atingirem a temperatura ambiente. Esta é a etapa mais importante no processo de extração dos ácidos graxos e, por isso, deve ser realizada seguindo todas as orientações apresentadas.

Nota: É importante dizer que não é recomendado o uso de banho de água gelada, mas sim a temperatura ambiente.

4. Os ácidos graxos metilados são separados da fase aquosa com adição de $1,25 \pm 0,1$ mL do reagente de extração (100 mL de hexano e 100 mL de terc-butil metil éter) e agitados lentamente em rotator clínico por 10 minutos. Poderá ser observada a formação de duas fases: uma superior (orgânica) e outra inferior (aquosa). Com a ajuda de uma pipeta Pasteur retire a fase aquosa (inferior) e a descarte, reservando a fase orgânica (superior) ainda nos tubos.

Nota: Faz-se necessário o uso de uma pipeta Pasteur para cada amostra, a fim de que não ocorram contaminações.

5. As amostras são finalmente lavadas com a adição de $3,0 \pm 0,1$ mL de solução de lavagem (10,8 g de hidróxido de sódio e 900 mL de água destilada e deionizada) e agitadas lentamente em rotator clínico por 5 minutos. Uma emulsão entre as fases orgânica e aquosa poderá ser formada e, neste caso, os tubos amostrais devem passar por centrifugação a 2.000 RPM por 3 minutos. A fase orgânica superior, contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos – FAMES, é então transferida com a utilização de pipeta Pasteur para frascos de vidro (vials de 2 mL) para análise cromatográfica.

Nota: Recomendamos finalmente que todos os reagentes utilizados na preparação das soluções necessárias no processo de extração dos ácidos graxos sejam de marca de renome, para evitar o risco de uma identificação equivocada. No processo descrito pelo MIS há a indicação do uso de reagentes da marca Fisher.

Etapas III – Injeção no Cromatógrafo Gasoso

O Cromatógrafo Gasoso Agilente GC 6850 utilizado na identificação das bactérias possui um programa de sequenciamento que permite a realização de injeções automáticas de várias amostras, o que torna o processo mais ágil. Assim, basta programar o Sherlock Sequencer para dar início às identificações.

Etapas IV – Obtenção de Cromatogramas

O Cromatógrafo Gasoso Agilente GC 6850 possui como acessórios uma coluna capilar Ultra 2 e um Detector de Ionização em Chama (FID) que são responsáveis pela identificação dos ésteres de ácidos graxos metilados da bactéria. Estes ésteres passam inicialmente pela coluna capilar e aí são separados.

Em seguida passam pelo FID, que processa o resultado (tempo de retenção do ácido graxo na coluna, proporção da área/altura e porcentagem da área do pico) criando um sinal que é guardado em um programa chamado ChemStation. Uma amostra de bactéria é composta por vários sinais (que são apresentados no gráfico na forma de picos). Após todos os sinais da amostra terem sido depositados no ChemStation, este imprime os sinais plotados e integrados, originando um gráfico que é chamado de cromatograma.

Etapa V - Identificação de Bactérias

Quando a corrida da amostra é encerrada e o cromatograma é obtido, o tempo de retenção, a proporção da área/altura e a porcentagem da área de cada pico são transmitidos do ChemStation para o programa Sherlock que promoverá outros processamentos dos dados. Como já dito, o cromatograma é um gráfico que contém vários picos, sendo que cada pico observado nele é identificado e nomeado.

Quando é terminada a nomeação de todos os picos do cromatograma, o Sherlock irá comparar os resultados obtidos à biblioteca associada ao Método de Identificação de Microorganismos (MIS). A biblioteca leva em consideração tanto o nome do pico, quanto a sua porcentagem obtida. Após a procura e comparação com os dados da biblioteca, o computador imprime o Relatório de Composição da amostra, que é o relatório em que aparece a identificação da bactéria que se está analisando (Tabela 1).

Etapa VI – Obtenção de Dendograma

O dendograma é uma técnica de análise em agrupamento disposta graficamente que apresenta o relacionamento entre organismos.

A distância euclidiana é um método predativo que ajuda a quantificar a diversidade por meio de medidas de dissimilaridade. Considerando estas medidas serão aplicados métodos aglomerativos, permitindo o estudo da diversidade entre os materiais avaliados.

Tabela 1: Relatório de composição da análise do perfil de ácidos graxos que compõe uma amostra bacteriana, mostrando os picos de referência obtidos pelo cromatograma que irão identificar quali e quantitativamente tal amostra.

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak	Percent	Comment1	Comment2
1.709	3.617E+8	0.029	—	7.012	SOLVENT	—	< min rt	
1.812	2488	0.008	—	7.218		—	< min rt	
1.900	1779	0.033	—	7.396		—	< min rt	
1.981	414	0.033	—	7.557		—	< min rt	
2.048	468	0.032	—	7.691		—	< min rt	
2.610	279	0.027	—	8.819		—	< min rt	
4.440	1599	0.030	1.063	11.609	12:0 ISO	0,92	ECL	Reference
4.796	502	0.033	1.043	12.000	12:0	0,28	ECL	Reference
5.498	19723	0.034	1.017	12.614	13:0 ISO	10,85	ECL	Reference
5.599	2281	0.034	1.013	12.702	13:0	1,25	ECL	Reference
6.783	10287	0.035	0.983	13.619	14:0 ISO	5,47	ECL	Reference
7.302	5090	0.037	0.973	14.000	14:0	2,68	ECL	Reference
7.550	451	0.038	—	14.161		—		
8.261	57042	0.040	0.960	14.623	15:0 ISO	29,63	ECL	Reference
8.399	8237	0.039	0.958	14.714	15:0	4,27	ECL	Reference
8.839	468	0.039	0.953	15.000	15:0	—	ECL	
9.486	1648	0.041	0.947	15.389	16:1 w7c	0,85	ECL	
9.645	5088	0.043	0.946	15.484	Sum In	2,61	ECL	16:1 ISO
9.881	12306	0.044	0.944	15.625	16:0 ISO	6,29	ECL	Reference
10.104	569	0.042	0.943	15.760	16:1 w11c	0,29	ECL	
10.267	21244	0.045	0.942	15.857	Sum In	10,83	ECL	15:0 ISO
10.502	9817	0.044	0.940	15.999	16:0	5,00	ECL	Reference
10.882	823	0.044	0.938	16.218	15:0 2OH	0,42	ECL	
11.178	5932	0.051	0.937	16.390	ISSO 17:1	3,01	ECL	
11.306	7735	0.051	0.936	16.463	ISSO 17:1	3,92	ECL	
11.445	1480	0.045	0.936	16.544	17:1	0,75	ECL	
11.596	18440	0.048	0.935	16.631	17:0 ISO	9,33	ECL	Reference
11.757	2096	0.044	0.934	16.724	17:0	1,06	ECL	Reference
13.998	581	0.041	0.928	17.999	18:0	0,29	ECL	Reference
---	5088	—	---	---	Summed	2,61	12:0 ALDE	unknown
---	---	---	---	---	---	---	16:1 ISO	14:0
---	21244	---	---	---	Summed	10,83	16:1	15:0 ISO

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference Peaks: 13

Total Response: 192971

Total Named: 192520

Percent Named: 99,77%

Total Amount: 185189

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,862	Bacillus-cereus-GC subgroup A
	0,681	Bacillus-thuringiensis-kurstaki
	0,582	Bacillus-thuringiensis-israelensis
	0,531	Bacillus-cereus-GC subgroup B

A distância euclidiana pode ser estimada tomando-se por base dados sem repetições, como é o caso de dados oriundos de banco ativo de germoplasma, tornando-se viável a sua aplicação.

Experiências realizadas com um número grande de amostras microbianas resultaram nas seguintes diretrizes para a Distância Euclidiana:

- Amostras com Distância Euclidiana igual ou menor que 10 são consideradas da mesma espécie;
- Amostras com Distância Euclidiana igual ou menor que 6 são tipicamente da mesma subespécie ou biótipo;
- Amostras com Distância Euclidiana igual ou menor que 2,5 são de duas corridas diferentes da mesma linhagem.

Mas tem-se que tomar cuidado na interpretação de um dendograma, pois se um acoplamento ocorre numa faixa de 10 ou mais isto não quer dizer que os dois microrganismos são de diferentes espécies.

Assim sendo, o dendograma apresenta informações sobre amostras que são agrupadas. Ele também pode indicar contaminação ou então a presença de um organismo diferente. O dendograma pode ser usado para determinar um grupo de uma determinada amostra bem como separá-lo confiavelmente em dois ou mais subgrupos.

Considerações Finais

A técnica de identificação de bactérias, por utilização do MIS, tem apresentado grandes vantagens para uso laboratorial. A principal delas é relativa ao tempo gasto em um processo de extração, que leva no máximo três dias para ocorrer, em relação à quantidade de material obtido para identificação (cerca de 20 a 30 ésteres de ácidos graxos metilados/processo). Esta é uma técnica recente, porém promissora, e que vem sendo amplamente divulgada e empregada por pesquisadores de todos os continentes.

Literatura Consultada

SASSER, M. **Identification of bactéria by gás chromatography of celular fatty acids**. Newark, DE: MIDI, 1990. (Tech. Note, 101)

MICROBIAL identification system operating manual version 4.0. Newark, DE: MIDI, 2001.