

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
Multiplificação 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

Produção de bactérias para uso no controle biológico

Deise Maria Fontana Capalho¹

Muitas bactérias produzem moléculas importantes para a indústria e para a saúde humana (antibióticos e enzimas entre outros), enquanto outra fração representa problema por produzir toxinas e apresentar um endosporo dormente e altamente resistente, que sob condições favoráveis pode germinar e se transformar numa célula vegetativa.

As bactérias formadoras de esporos pertencem em sua maioria à família Bacillaceae, sendo que o gênero aeróbio *Bacillus* inclui as bactérias formadoras de esporos de maior potencial para o controle biológico pelas mesmas características que lhes conferem resistência às condições adversas ambientais e de processamento industrial.

A aplicação destas bactérias como geradoras de moléculas com ação de controle sobre outros microrganismos requer grandes quantidades do agente ativo, que só é interessante se esta bactéria se desenvolver em meio artificial (*in vitro*), utilizando-se de modernas técnicas e equipamentos de fermentação.

O desenvolvimento de microrganismos em meio artificial sob condições controladas de temperatura, agitação e aeração é normalmente denominado processo fermentativo. A especificidade de ação ou produção de metabólitos em cada espécie e sub-espécie de *Bacillus* está relacionada às características intrínsecas àquela espécie, e também à composição do meio de cultivo e parâmetros sob os quais tal microrganismo se desenvolve, como composição do meio de cultura, temperatura, pH e outros. A comparação da velocidade de crescimento e produção de esporos de diferentes cepas de *Bacillus* será assunto desta prática.

Objetivo

O objetivo desta prática é observar o efeito das condições do processo fermentativo sobre o crescimento e esporulação de diferentes cepas de *Bacillus* em meio nutritivo líquido. Cada cepa tem especificidade característica para uso no controle biológico e seu desenvolvimento é afetado pela composição do meio de cultivo e os parâmetros de fermentação.

¹ Engenheira de Alimentos, Doutora, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, 13820-000 Jaguariúna, SP.

Procedimento

1. Pré-fermentação

Para garantir uma boa atividade e velocidade de crescimento, as culturas oriundas do tubo ou placa-estoque (meio ágar nutriente) passam pela etapa de “pré-fermentação”:

- distribuir 100 mL de meio de pré-fermentação em cada frasco erlenmeyer de 250 mL. Fechar com tampa de algodão e autoclavar a 121°C por 20 minutos;
- retirar uma alçada da cultura estoque e inocular em cada frasco de pré-fermentação previamente preparado;
- manter os frascos sob agitação em agitador orbital por 12-24 horas (geralmente 120 rpm; $30 \pm 2^\circ\text{C}$). O período deve ser estabelecido para cada caso, acompanhando as etapas de desenvolvimento ao microscópio;
- a pré-fermentação deve ser finalizada quando a maioria das células estiverem na fase de crescimento vegetativo, que garante a melhor condição de desenvolvimento na etapa de fermentação;
- ao final do período de pré-fermentação é feita contagem de células em câmara de Neubauer e este número é ajustado (diluições sucessivas) para que o inóculo tenha entre 1 e 5×10^8 células vegetativas/mL.

2. Fermentação em frascos Erlenmeyer

- Distribuir 100 mL de meio de fermentação em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL. Fechar com tampa de algodão e autoclavar a 121°C por 20 minutos;
- utilizar o inóculo já pré-ajustado para dar início ao processo de fermentação. Utilizar 5% do volume de meio contido no frasco de fermentação como volume de inóculo. Nesta prática, o volume de inóculo será então de 5 mL do caldo da pré-fermentação utilizado para inocular cada frasco determinado e previamente preparado;
- manter os frascos sob agitação em agitador orbital (geralmente 150 rpm; $30 \pm 2^\circ\text{C}$);

- acompanhar o desenvolvimento dos microrganismos até a obtenção de esporos ou o início da fase de lise celular (observação ao microscópio de contraste de fase) conforme estabelecido em cada grupo de trabalho. Esta finalização varia para cada produto desejado algumas vezes o controle de doenças se baseia na competição por espaço e nutrientes, o que exige uma grande quantidade de células vegetativas em fase logarítmica de crescimento (que é obtido nas etapas iniciais do processo de produção massal). Outras vezes a ação biocida é oriunda do desenvolvimento de enzimas ou toxinas (metabólitos) produzidas em diferentes fases do crescimento celular, motivo pelo qual a fermentação deverá ser realizada de forma a obter grande quantidade de células neste determinado estágio de crescimento. Em outros casos o controle é oriundo da presença de esporos, motivo pelo qual a fermentação deverá ser conduzida visando obter este estágio de desenvolvimento da bactéria, mais longo do que os dois casos anteriores;
- quando o estágio determinado para cada grupo for atingido, retirar os frascos e centrifugar (geralmente 5.000 a 10.000 rpm por 10 minutos), utilizando o centrifugado para determinação de massa celular (quantificação de células viáveis, esporos viáveis, enzimas intracelulares) e ensaios de verificação da ação biocida. O sobrenadante é utilizado para determinação da presença de enzimas e toxinas extracelulares, antibióticos ou outras moléculas que sejam produzidas e excretadas durante o crescimento celular. Geralmente o material (centrifugado e sobrenadante separadamente) pode ser guardado em geladeira por 1 a 3 dias.

3. Fermentação em mini-fermentador

- Distribuir o volume de meio de fermentação em cada frasco do fermentador. O volume a ser utilizado, se não for estabelecido pelo fabricante, não deve ultrapassar 80% do volume total do frasco do fermentador, uma vez que há necessidade de manter um espaço para troca de gases e para eventual formação de espuma;
- fechar a tampa adequadamente e autoclavar (condições estabelecidas pelo fabricante);
- após resfriamento, conectar todos os controles conforme orientação do fabricante e acionar os controles de forma a ajustar o reator para as condições de fermentação necessárias. De forma geral, as condições são: Temperatura: $30 \pm 2^\circ\text{C}$; Aeração: 1 v/v/m (1 L ar/L meio/minuto); Agitação: 200-400 rpm;

- utilizar o resultado da pré-fermentação para inóculo do frasco de fermentação. Utilizar 5% do volume final do frasco de fermentação como volume de inóculo;
- coletar amostras periodicamente para acompanhar o desenvolvimento dos microrganismos até a obtenção da etapa de desenvolvimento desejada;
- para encerrar o processo, desligar o fermentador (aeração e agitação);
- filtrar ou centrifugar, conforme disponibilidade do laboratório. Geralmente a centrifugação acontece utilizando 5.000 a 10.000 rpm por 10 minutos;
- para o caso em que o produto final é o esporo bacteriano, o caldo final pode ter seu pH ajustado para pH 4.0 com ácido acético, e o material decantado pode ser guardado a temperatura ambiente ou refrigerador por vários dias.

4. Acompanhamento do processo fermentativo

- Crescimento das células bacterianas (em quantidade e em estágio de desenvolvimento) pode ser acompanhado por metodologias básicas de contagem (plaqueamento em meio de cultivo; câmara de contagem ou também denominada "de Neubauer") de uso corrente em laboratórios de microbiologia (metodologias descritas em Alves (1998));
- baseado no conceito de que o desenvolvimento celular modifica o índice de refração da luz no meio de cultivo, pode-se acompanhar o crescimento bacteriano pela leitura da absorbância (ou de seu inverso, a transmitância) em refratômetro a 640 nm; por se tratar de leitura simples e rápida, carecendo apenas de uma curva de calibração previamente estabelecida, é uma prática presuntiva bastante utilizada, com a única ressalva de que as diferentes etapas de desenvolvimento interferem de forma diferenciada na refração da luz, não sendo, portanto, uma medida quantitativa adequada para o caso de esporos bacterianos (metodologia referenciada em Capalbo e Morais (1984));
- outro parâmetro indicativo de desenvolvimento bacteriano em meio líquido, é a variação que se pode observar no pH do meio de cultura. Ao longo do tempo de fermentação o pH, inicialmente próximo à neutralidade, cai a valores próximos de 5,5; posteriormente, na etapa de esporulação celular, o pH retorna à neutralidade e se eleva a valores entre 8 e 9, indicando esporulação e início de lise celular.

Prática 1 – Produção de *Bacillus* sp. em meio genérico

Este tipo de meio é indicado para etapas iniciais de estudo com microrganismos cuja forma de ação de controle não está bem definida e pequenas quantidades de meio de cultivo serão utilizadas.

Meio para pré-fermentação e fermentação

Para esta prática utilizar caldo nutriente com meio de cultivo da pré fermentação e da fermentação. Preparar conforme orientação do rótulo da embalagem.

Prática 2 – Produção de *Bacillus* sp. em meio de esporulação contendo resíduos da agroindústria

Este meio de cultura é mais indicado para casos onde se deseja obter grande quantidade de massa celular ou para obtenção de esporos. Neste caso a composição do meio de pré-fermentação é mais rica em sais numa etapa em que pouca quantidade de meio é utilizada. A utilização de resíduos agroindustriais (geralmente contendo ainda açúcares, alguns aminoácidos e sais) é indicada para produção em maior escala, pois reduz o custo de produção.

Comparação de resultados

Os resultados obtidos pelos diferentes métodos devem ser comparados para se observar as diferentes velocidades de crescimento, comportamento frente às condições de crescimento em frascos agitados e minifermentador, bem como as diferenças em rendimentos atingidos.

Referências Bibliográficas

ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1988. 1163 p.

CAPALBO, D. M. F.; MORAIS, I. O. Contribuição ao estudo de fermentação contínua com *Bacillus thuringiensis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 6., 1984, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Associação Brasileira de Engenharia Química, 1984. v. 2, p. 443-460.

DE BARJAC, H.; LECADET, M. M. Dosage biochimique de l'écotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymérase bactérienne. **C. R. Acad. Sc. Paris**, v. 282, p. 2119-2122, 1993.

DULMAGE, H. T. Developments of isolates of *Bacillus thuringiensis* and similar aerobic microbes for use in developing countries. In: SALAMA, H. S.; MORRIS, O. N.; RACHED, E. (Ed.). **The biopesticide *Bacillus thuringiensis* and its applications in developing countries**. Cairo: National Research Center and IDRC, 1993. p. 443-460.

DULMAGE, H. T.; RHODES, R. A. Production of pathogens in artificial media. In: BURGESS, H. D.; HUSSEY, N. W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1973. p. 507-540.

HESELSTINE, C. W. A millenium of fungi, food and fermentation. **Mycology**, v. 57, p. 149-197, 1965.

LYSANSKY, S. G.; COOMBS, J. Developments in the market for biopesticides. In: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE - PESTS AND DISEASES, 1994, Brighton. **Proceedings**. Brighton: BCPC, 1994. p. 1049-1054.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. By-products from food industries: utilization for bioinsecticide production. In: YANO, T.; MATSUNO, R.; NAKAMURA, K. (Ed.). **Developments in food engineering**. London: Blackie, 1994. p. 1020-1022.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. (Coord.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Embrapa, 1991. p. 232-272.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, R. O. Solid and liquid waste utilization in fermentation process to get bacterial insecticide. In: SPIESS, W. E. L.; SHUBERT, H. (Ed.). **Engineering and food: advanced processess**. London: Elsevier, 1990. p. 785-792.

THOMPSON, P. J.; STEVENSON, K. E. Mesophilic sporeforming aerobes. In: SPECK, M. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 1984. p. 211-220.