

# Tolerância a Estresses Ambientais de Agentes de Controle Biológico da Podridão Vermelha do Sisal Isolados no Semiárido Baiano

## Environmental Stress Tolerance of Biological Control Agents of Rot Red of Sisal Isolates in the Semi-arid of Bahia State

---

*Jéssica de Souza Lima*<sup>1</sup>; *Leonardo de Oliveira Barbosa*<sup>2</sup>; *Ítala Layanne Alves Santos*<sup>3</sup>; *Thalita de Freitas Gomes Barbosa*<sup>3</sup>; *Jorge Teodoro de Sousa*<sup>4</sup>; *Carlos Alberto Tuão Gava*<sup>5</sup>

### Abstract

Ongoing climate change will alter climate variables such as temperature and incidence of solar radiation which may interfere with the efficiency of biological control agents. Thus, it is necessary to study and select control agents adapted to these new weather conditions. This study aimed to evaluate the tolerance of *Brevibacterium* sp. (90), *Bacillus pumilus* (105), *Serratia rubidaea* (127), *Paenibacillus* sp. (512), *Bacillus* sp. (INV), *Bacillus* sp. (BMH), selected for the biological control of red rot of sisal caused by the fungus *Aspergillus niger*, to environmental stresses such as high temperatures, salinity, pH and low water availability. In general, it was observed that the six bacterial strains were affected by the reduced water potential of the medium but were able to grow at optimal levels of pH between 6.9 and 8.8 and temperatures between 27.7 and 33.3°C. There was no growth of bacterial strains in conditions of extreme pH or NaCl concentration of more than 10%.

**Keywords:** Biological control, red rot of sisal, water stress, high temperatures.

### Introdução

Em condições naturais, variáveis climáticas podem impor limitações à eficiência dos agentes de controle biológico de doenças de plantas. Em um cenário de mudanças climáticas, algumas variáveis podem tornar a

---

<sup>1</sup>Doutoranda, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, jessyka\_llima@hotmail.com;

<sup>2</sup>Mestrando, UFRB, Cruz das Almas, BA.

<sup>3</sup>Graduanda, Universidade de Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

<sup>4</sup>Professor, UFRB, Cruz das Almas, BA.

<sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

colonização de superfícies de planta ou do solo ainda mais difíceis. Assim, se faz necessária a adoção de medidas mitigadoras destes efeitos e a seleção de micro-organismos adaptados a estresses abióticos como alta temperatura, baixa disponibilidade de água e elevada salinidade, comuns na região semiárida e que podem se tornar ainda mais restritivas. Com isto, é importante obter agentes de controle competitivos, capazes de se estabelecer rapidamente no ambiente e tolerar estresses abióticos.

O cultivo do sisal (*Agave sisalana* Perrine) concentra-se na região semiárida do Nordeste brasileiro, geralmente, em localidades onde a situação climática é tão desfavorável que esta se torna a única cultura que se adapta a essas condições (ALVARENGA JR., 2012). Em consequência, a cultura do sisal se torna uma das únicas alternativas de captação de renda pelo homem do campo (CNA, 2010). Apesar de sua importância socioeconômica, produtores de sisal vêm sofrendo com os prejuízos da doença comumente chamada de podridão vermelha, causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Ressalta-se que, até o momento, não existe um método eficaz para o controle da doença, exceto os métodos culturais. Neste contexto, o uso de bactérias como eficientes agentes antagônicos contra *A. niger* tem se mostrado uma alternativa e vem sendo estudado (MAGALHÃES, 2013; SILVA, 2012).

Com isso, objetivou-se, neste trabalho, avaliar *in vitro* a tolerância de isolados bacterianos com potencial para o controle biológico de *Aspergillus niger* aos diferentes estresses ambientais, como altas temperaturas, salinidade, pH e disponibilidade de água.

## Material e Métodos

Foram testados seis isolados bacterianos, sendo *Brevibacterium* sp. (Bac90), *Bacillus pumilus* (Bac105), *Serratia rubidaea* (Bac127), *Paenibacillus* sp. (Bac512) e *Bacillus* sp. (BacINV e BacBMH), obtidos de diferentes coleções de micro-organismos. Todas as bactérias foram isoladas de mudas de sisal em solos da região sisaleira, no Estado da Bahia, e apresentaram potencial de biocontrole da podridão vermelha do sisal (MAGALHÃES, 2013; SILVA, 2012).

Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar nutriente por 24 h e, após crescimento, as bactérias foram transferidas para erlenmeyer contendo 50 mL de caldo nutriente. A incubação foi feita a  $25 \pm 2$  °C sob agitação de 120 rpm, durante 24 h. Logo após, as células bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 3 min e ressuspendidas em solução salina (0,85% de NaCl). Cada suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro na densidade óptica de 482 nm para 0,1.

Em seguida, 20 µL de cada suspensão foram adicionados a 100 µL de caldo nutriente em “poços” (wells) de placas de ELISA. Para o teste de tolerância à temperatura, as placas de ELISA contendo as suspensões bacterianas foram incubadas em BOD a 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Para o teste de salinidade, adicionou-se cloreto de sódio (NaCl) ao caldo nutriente, nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%. Já para o teste de pH, ajustou-se o caldo nutriente para pH 3, 5, 7, 9 e 11, empregando-se soluções de HCl 1,0 M e NaOH 1,0 M. Avaliou-se ainda a tolerância dos isolados bacterianos em diferentes potenciais osmóticos no caldo nutriente por meio de um gradiente de concentração de Polietilenoglicol - PEG 6000 (0, 119,6 g; 178,3 g; 223,6 g; 261,9 g; 295,7 g/1000 mL) com os respectivos potenciais osmóticos (PO) (0, -2, -4, -6, -8, -10 MPa) conforme proposto por Villela et al. (1991). Os microrganismos foram incubados a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  °C durante 24 horas e o crescimento bacteriano nas diferentes condições foi determinado com base na variação da

densidade ótica em leitor de placa de ELISA. Para cada isolado bacteriano utilizado como tratamento, utilizaram-se quatro repetições. Um tratamento controle foi incluído, contendo apenas o caldo nutriente e as suspensões bacterianas.

Os resultados obtidos foram submetidos a análises de variância e análises de regressão polinomial, sendo escolhido, no máximo, até o efeito quadrático para representação da variável analisada, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) acima de 50%. Utilizou-se o software Sisvar versão 4.0 (FERREIRA, 2000) para as análises.

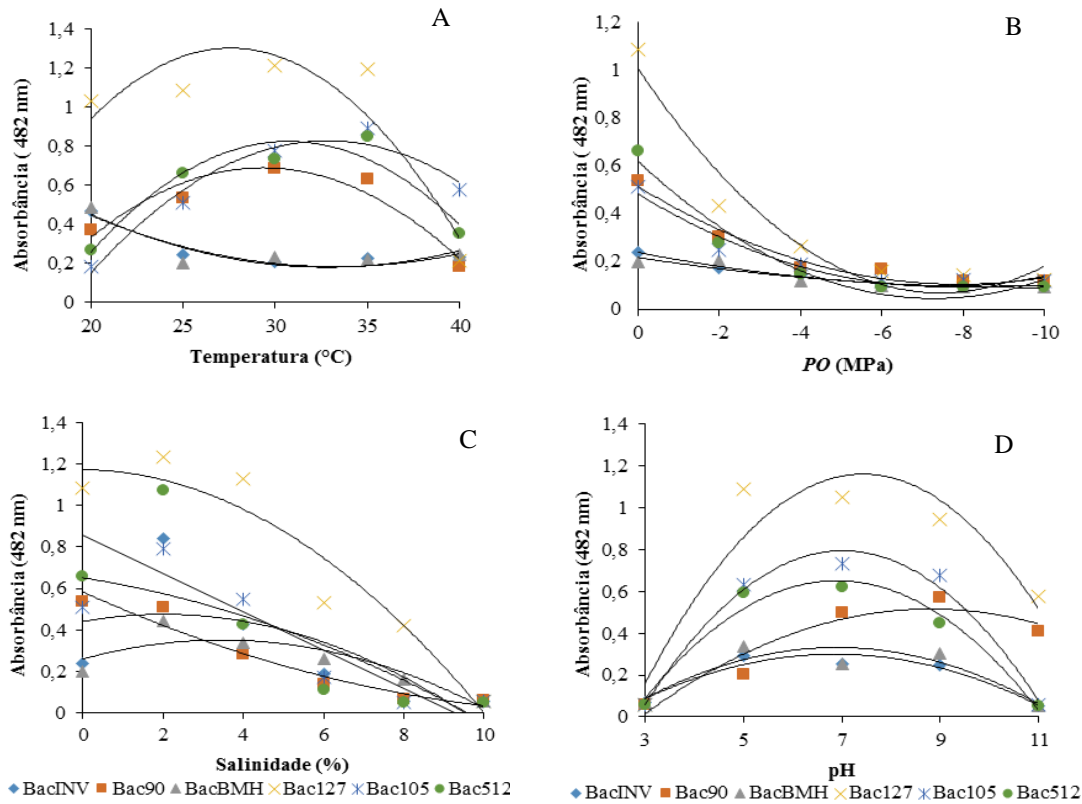
## Resultados e Discussão

A tolerância à temperatura foi dependente dos isolados avaliados, com interação significativa pelo teste de F ( $P < 0,05$ ) (Figura 1A). O crescimento das bactérias decresceu de forma quadrática em função do aumento das temperaturas, verificando temperatura ótima de crescimento de 33,1 °C para o isolado BacINV; de 32,1 °C para o BacBMH; 29,4 °C para o Bac90; 27,7 °C para o Bac127; 33,0 °C para o Bac105 e 30,0 °C para o isolado Bac512. Entretanto, na temperatura de 40 °C, um único isolado, Bac105, demonstrou crescimento moderado em 40 °C e, provavelmente apresenta mecanismo de adaptação à elevada temperatura. Por outro lado, este isolado apresentou uma diminuição drástica do seu crescimento na temperatura de 20 °C, indicando que este possui baixa tolerância às temperaturas mais reduzidas (Figura 1A).

Em relação às avaliações da tolerância dos isolados a diferentes potenciais osmóticos do meio (PO), observou-se que os seis isolados bacterianos demonstraram melhor crescimento em meio de cultivo com ausência de PEG6000, apresentando diminuição expressiva e crescimento constante com o aumento da concentração do osmólito e conseqüente queda do potencial hídrico do meio (Figura 1B).

Houve interação significativa entre os isolados bacterianos e as concentrações de NaCl estudadas para o crescimento bacteriano, indicando comportamento diferenciado entre os isolados. De forma geral, não houve crescimento bacteriano na concentração mais alta de NaCl (10%) (Figura 1C).

Observou-se interação significativa entre os isolados e os valores de pH quanto ao crescimento bacteriano (Figura 1D). As cepas bacterianas cultivadas sob diferentes pH mostraram que nenhum isolado cresceu em pH 3 e todos eles exibiram uma faixa ótima de crescimento entre pH 6,9 e pH 8,8 (Figura 1D). Em pH muito alcalino (pH 11), a maioria dos isolados bacterianos não apresentou crescimento, exceto para os isolados Bac90 e Bac127 (Figura 1D). Em valores de pH ácido (pH 3 e pH 5), os isolados Bac105 e Bac512 apresentaram baixa tolerância não havendo crescimento bacteriano. Resultados similares relativos à elevada tolerância de bactérias baciláceas a condições adversas de temperatura e salinidade foram observados por Shiva et al. (2014), nos quais os isolados avaliados estabeleceram colônias em condições de até 40 °C e 5% de NaCl.



**Figura 1.** Efeito da temperatura (°C) (A), potencial osmótico (PO - MPa) (B), salinidade (%) (C) e pH (D) no crescimento bacteriano expresso em densidade ótica.

Dada à estreita afinidade entre plantas e micro-organismos, as alterações climáticas resultarão em efeitos ainda desconhecidos, podendo influenciar substancialmente estas interações (DRIGO et al., 2008). Alterações no teor de CO<sub>2</sub>, temperatura e disponibilidade de água produzirão impactos significativos tanto na interação entre plantas e patógenos, quanto em suas interações com micro-organismos benéficos (COMPANT et al., 2010). Micro-organismos que colonizam os diferentes tecidos vegetais poderão ser afetados, por exemplo, em função das respostas fisiológicas das plantas. Portanto, uma etapa de estudos da tolerância dos isolados às variáveis climáticas se torna necessária para a recomendação de agentes de controle em um cenário de mudança. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar variabilidade na resposta dos agentes de controle biológico em potencial para o controle de podridão vermelha em cultivos de sisal. Entre estes, os isolados Bac105, Bac127 são capazes de tolerar elevadas temperaturas, altas concentrações de NaCl e pH ácidos e BacBMH é mais tolerante à baixa disponibilidade de água. Contudo, novos estudos serão realizados para verificar se a eficiência de controle dos isolados bacterianos serão afetadas sob condições de estresses abióticos.

## Conclusões

Os seis isolados bacterianos foram capazes de crescer em valores de pH entre 6,9 e 8,8 e temperaturas entre 27,7 e 33,3 °C, exceto nas condições extremas.

Todos os isolados bacterianos foram afetados pela redução do potencial hídrico do meio.

## Referências

- ALVARENGA JÚNIOR, E. R. **Cultivo e aproveitamento do sisal (*Agave sisalana*)**: dossiê técnico. Belo Horizonte: CETEC, 2012. 34 p.
- COMPANT, S.; HEIJDEN, M. G. A. van der; SESSITSCH, A. Climate change effects on beneficial plant–microorganism interactions. **Fems Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 73 p. 197-241, 2010.
- CONFEDERAÇÃO DE AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Sisal: problemas e soluções**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 25 jan. 2010.
- DRIGO, B.; KOWALCHUK, G. A.; VEEN J. A. van. Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on microbial community structure and activities in the rhizosphere. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 667–679, 2008.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255-258.
- MAGALHÃES, V. C. **Uso de bactérias de restinga no controle da podridão vermelha do sisal**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- SHIVA, S. A.; PAVANKUMAR, P.; SHANKAR, V. G. Characterization of effective bio-biocontrol agente *Bacillus* sp. SRB 27 with high salt tolerance and thermostability isolated from forest soil sample. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 25, p. 2547-2555, 2014.
- SILVA, A. C. M. **Densidades populacionais, diversidade e atividade de bactérias endofíticas de sisal contra *Aspergillus niger***. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- VILLELA, F. A.; DONI FILHO, L.; SEQUEIRA, E. L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 11/12, p. 1957-1968, 1991.