

Ampliação da Diversidade de Bactérias Cultiváveis do Solo e Avaliação de Isolados Raros Quanto à Atividade Contra Fitopatógenos

*Yasmim Sotero Bomfim Fraga*¹, *Deise Regina dos Santos*¹, *Thais de Jesus Santos*¹, *Érika Cristina Teixeira dos Anjos Brandão*², *Marcelo Ferreira Fernandes*³

Resumo

O presente estudo teve por objetivo ampliar a diversidade de bactérias cultiváveis do solo, como também avaliar o potencial dos isolados raros quanto à atividade contra fitopatógenos, devido à necessidade de alternativas sustentáveis. Para isso, realizou-se o isolamento e cultivo de bactérias de solos supressivos utilizando-se protocolos descritos por Hayakawa et al. (1997 e 1994) na tentativa de isolar bactérias raras. O método de dupla camada consistiu no teste preliminar para a seleção de isolados com potencial de antagonismo contra os fitopatógenos escolhidos para este estudo, o fungo *Thielaviopsis paradoxa* e a bactéria *Xanthomonas campestris*. O crescimento dos patógenos na presença de extratos extracelulares dos isolados de bactérias do solo foi determinado por gravimetria de filtrados dos patógenos secos para *T. paradoxa* e por espectrofotometria para *X. campestris*. Observou-se em relação ao teste de antagonismo em meio líquido que os isolados 8D, 12D e 90D foram capazes de inibir totalmente o crescimento relativo da *X. campestris*, enquanto para *T. paradoxa* os isolados tiveram que demonstraram um efeito inibitório de em média 80% foram 119D e 98D. Os resultados preliminares obtidos neste estudo demonstram o potencial de bactérias isoladas de solos supressivos a fitopatógenos no controle de fitopatógenos de importância agrícola como os utilizados nos experimento de antibiose in vitro.

Palavras-chave: antibiose, extratos extracelulares, solos supressivos, *Thielaviopsis paradoxa* e *Xanthomonas campestris*.

¹ Ciências Biológicas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, yasmim.bomfim@hotmail.com.

² Ciências Biológicas, doutora, Ciências Biológicas, bolsista da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, erikaanjos@yahoo.com.br.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, marcelo.fernandes@embrapa.br.

Introdução

O solo é um ambiente altamente complexo por apresentar vários parâmetros de interação dentre os quais pode-se citar textura, estrutura, teor de água, pH, variações climáticas e atividade biótica (ROBE et al., 2003). Essa interação leva a uma variedade de microambientes, o que reflete na composição de espécies microbianas. Porém, grande parte dessa biodiversidade ainda é desconhecida. Apenas uma pequena proporção da diversidade bacteriana total do solo (0,1-10%) tem sido recuperada e cultivada por técnicas convencionais (TORSVIK et al., 1990). A dificuldade de criar um ambiente semelhante ao natural é um dos fatores limitantes que podem estar relacionados a não-culturabilidade dos microrganismos em laboratório.

Bactérias do solo constituem uma das mais importantes fontes para a descoberta de novos compostos bioativos, uma vez que são responsáveis por cerca de 50% do total de antibióticos naturais utilizados comercialmente (RAVIKUMAR; FREDIMOSSES e GNANADESIGAN, 2012). Estudos têm revelado a eficácia destes compostos na supressão de fitopatógenos. Isso se deve ao fato dessas bactérias produzirem policetídeos e peptídeos não ribossomais que apresentam um elevado potencial antimicrobiano contra patógenos. O isolamento de organismos de cultivo raro tem sido proposto como uma alternativa eficiente para o isolamento de moléculas bioativas até então não conhecidas (PARSLEY et al., 2011).

Nos últimos anos, o controle biológico tem se apresentado como uma alternativa de controle para fitopatógenos. A busca por este tipo de controle tem sido motivada por diversos problemas ambientais causados pelo uso indiscriminado de agrotóxico, além do baixo custo de produção. Portanto, este estudo teve por objetivo ampliar a diversidade de bactérias cultiváveis do solo, bem como avaliar o potencial dos isolados raros quanto à atividade contra fitopatógenos.

Material e Métodos

Amostras de solo de três municípios de Pernambuco (Bonito, Camocim de São Félix e Bezerros), com atividade supressiva a diferentes patógenos, foram utilizadas para o isolamento das bactérias da Coleção avaliada neste

estudo. Após coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do solo (LMS) da Embrapa Tabuleiros Costeiros, onde foram peneiradas (2 mm de abertura) e secas ao ar por 24h. Os isolados foram obtidos em seis meios de cultivo (ISP2, ISP2 diluído 1:10, ISP2 diluído 1:100, VL55, YMA e YMA diluído 1:10), sem pré-tratamento das amostras e com os seguintes pré-tratamentos (i) cloramina T a 1% com incubação a 30° C por 30 min e (ii) fenol a 1% com incubação a 30°C por 30 min, de acordo com Hayakawa e colaboradores (1994; 1997), visando o isolamento de bactérias de cultivo raro. Além disso, todos os meios de cultura citados foram solidificados com gelatina (Phytagel, Sigma) na concentração de 1,8% e suplementados com cicloheximida (10 µg/ml). Para seleção inicial dos isolados com potencial bioativo foi realizado o método de dupla camada frente ao fitopatogêno *Thielaviopsis paradoxa* (TC 003) do banco de dados do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju – SE) . Os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana contra o fungo *T. paradoxa* em ensaios qualitativos prévios foram selecionados para este estudo. A fase seguinte consistiu de testes de antibiose quantitativos para avaliar o crescimento do fungo *T. paradoxa* na presença de extratos extracelulares do crescimento destes isolados em meio YM líquido. Para isto, os extratos extracelulares de cada isolado foram produzidos a partir da inoculação de 100 µL de cada bactéria em meio líquido YM, o qual foram incubados a 30°C sob agitação a 120 rpm durante 7 dias. Este meio de cultura foi transferido para tubos falcons esterilizados, sendo em seguida centrifugados (14.000rpm/5min) e o sobrenadante filtrado em membrana bacteriológica de 0,22 µm. Isolados de *Bacillus pumilus* (estirpe QST 2808) provenientes de um fungicida comercial foram submetidos às mesmas condições citadas para obtenção dos respectivos extratos. O fungo *T. paradoxa* foi crescido em meio BDA durante sete dias e posteriormente o micélio foi coletado e o inoculo fúngico foi então ajustado para a concentração de 10⁶ conídios/mL. Realizou-se o teste de antagonismo utilizando-se as seguintes proporções: 5 mL de meio BD líquido, 1mL de extrato extracelular de cada isolado bacteriano e 1mL de conídios de *T. paradoxa*. Após incubação de cinco dias sob agitação de 120 rpm o conteúdo das amostras (meio de cultura + micélio fúngico) foram filtrados (em papéis de filtros qualitativos de 9 cm) e foram em seguida secas em estufa a 60°C por 48 h para pesagem em balança analítica. Para o teste de antibiose quantitativos dos extratos extracelulares contra o fitopatogêno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 629 IBSBF, obtida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (Campinas - SP) e cedida ao LMS Embrapa Tabuleiros

Costeiros (Aracaju – SE), utilizou-se placas de microtitulação nas quais foram inoculadas quantidades proporcionais dos agentes bacterianos, do fitopatógeno e do meio estéril (YM), levando-se em consideração o volume final dos poços de 300 μ L. Após incubação de 24 h foram realizadas leituras da absorvância em 500 nm referentes ao crescimento da *X. campestris* na presença ou ausência dos extratos extracelulares até que o crescimento da *X. campestris* atingisse o final da fase exponencial. Os mesmos extratos extracelulares foram utilizados para os dois testes de antibiose contra fitopatógenos. O tratamento controle consistiu da inoculação de apenas os fitopatógenos sem a presença de extratos extracelulares, que foram substituídos por água destilada esterilizada. Todos os tratamentos foram compostos de cinco repetições. O crescimento relativo foi calculado para *T. paradoxa* através da diferença do peso do papel filtro seco com do peso filtro seco mais micélio, onde obteve-se um resultado. Deste resultado subtrai-se o peso de possíveis vestígios do meio de inoculação (média = 5/papel + meio), chegando assim a quanto cresceu o micélio do fungo. Para *X. campestris*, diminuiu-se o resultado da média das repetições de cada isolado (leitura no espectrofotômetro) pelo resultado da média da leitura meio puro. Isto mostrou que quanto mais turva estava a amostra, mais tinha crescido a bactéria.

Resultados e Discussão

Na etapa de isolamento dos solos supressivos foram obtidos 257 isolados de bactérias de acordo com os três protocolos utilizados. Destes isolados, 24 foram selecionados em um experimento preliminar (teste de dupla camada) para o controle dos patógenos *Thielaviopsis paradoxa* e *Xanthomonas campestris* como produtores de composto bioativo, o que serviu como resultado qualitativo. Para que resultados quantitativos fossem obtidos, compararam-se os efeitos de extratos extracelulares das bactérias antagonistas sobre o crescimento dos patógenos em meio líquido específico, sendo o crescimento determinado por gravimetria de filtrados dos patógenos secos (em estufa a 60°C por 48 h) para *T. paradoxa* e por espectrofotometria para *X. campestris*. Neste estudo, o efeito de 24 extratos extracelulares foi avaliado quantitativamente contra ambos os fitopatógenos. Destes, oito (117D, 98D, 119D, 40D, 169D, 5D, 27D e 12D) inibiram o crescimento relativo do fitopatógeno *T. paradoxa*, sendo que três (117D, 98D e 119D) inibiram em média 80% do crescimento desse patógeno. Por outro lado, doze isolados (*Bacillus pumilus*, 65D, 34D, 56D, 29D, 63D, 42D, 60D, 122D, 1D, 14D e

95D) estimularam o crescimento do *T. paradoxa* além do crescimento médio do tratamento (Figura 1).

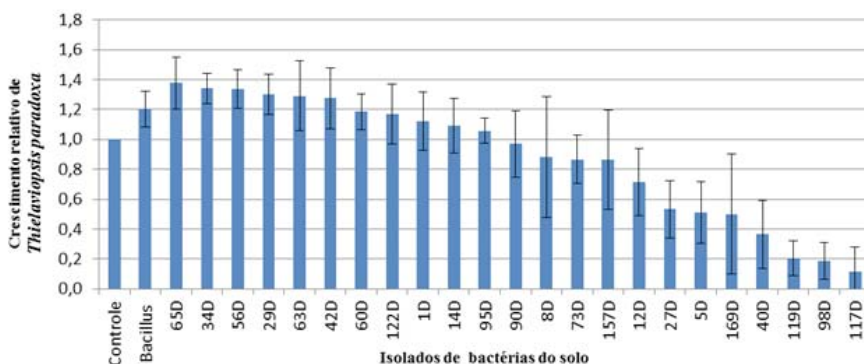


Figura 1. Crescimento relativo de *Thielaviopsis paradoxa* em isolados bacterianos do solo, *Bacillus pumilus* e controle.

As avaliações quantitativas da inibição do *X. campestris* feitas espectrofotometricamente mostraram que treze (*Bacillus pumilus*, 8D, 12D, 90D, 63D, 169D, 117D, 119D, 73D, 5D, 27D, 14D e 40D) dos 24 isolados inibiram o crescimento relativo desta bactéria, sendo que três (8D, 12D e 90D) apresentaram inibição de cerca de 100%. Ao contrário deste resultado, outros sete isolados (65D, 29D, 56D, 1D, 98D, 157D, 42D e 34D) permitiram o crescimento da *X. campestris* acima do tratamento controle (Figura 2). Ao comparar os dois resultados, observou-se que os isolados 8D e 90D foram capazes de inibir totalmente o crescimento da *Xanthomonas campestris*, enquanto que para o fitopatógeno *Thielaviopsis paradoxa* não se observou efeito de antibiose. Estudos semelhantes demonstram essa maior abrangência na capacidade de compostos bioativos de inibirem o crescimento de bactérias patogênicas do que quando comparados aos efeitos em fungos patogênicos. Isso pode estar relacionado com maior diversidade ou qualidade de compostos produzidos com atividade antibacteriana (NEDIALKOVA e NAIDENOVA, 2005; QIN et al., 2009).

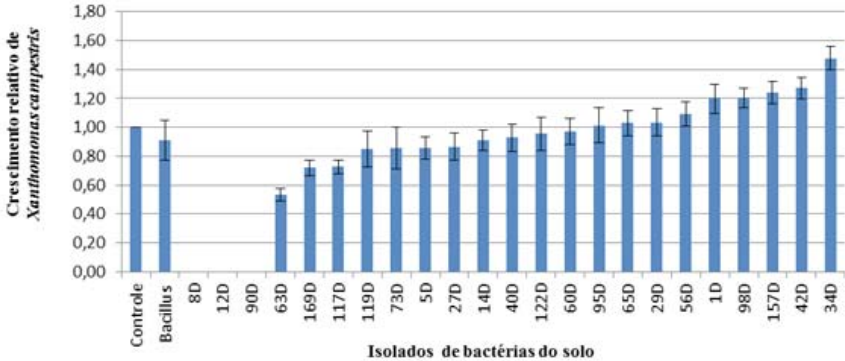


Figura 2. Crescimento relativo de *Xanthomonas campestris* em isolados bacterianos do solo, *Bacillus pumilus* e controle.

Conclusões

Bactérias isoladas de solos supressivos a fitopatógenos apresentam potencial contra fitopatógenos agrícolas, como o *Thielaviopsis paradoxa* e *Xanthomonas campestris*.

Referências

- ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.
- TORSVIK, V.; GOSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-787, 1990.
- RAVIKUMAR, S.; FREDIMOSSES, M.; GNANADESIGAN, M. Anticancer property of sediment Actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 92-96, 2012.
- PARSLEY, L. C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A. M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R. M.; LOPANIK, N. B.; LILES, R. M. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. **FEMS Microbiol. Ecology**, v. 78, p. 176-187, 2011.

LAZZARINI, A. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399-405, 2000.

HAYAKAWA, M.; MOMOSE, Y.; KAJIURA, T.; YAMAZAKI, T.; TAMURA, T.; HATANO, K.; NONOMURA, H. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 287-289, 1994.

HAYAKAWA, M.; IINO, H.; TAKEUCHI, S.; YAMAZAKI, T. Application of a method incorporating treatment with chloramines T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 599-602, 1997.

QIN, S. et al. Isolation, Diversity and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6176-6186, 2009.

NEDIALKOVA, D.; NAIDENOVA, M. Screening to Antimicrobial Active of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica. **Journal of Culture Collections**, v. 4, p. 29-35, 2005.