



CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE BACTÉRIAS BIOCONTROLADORAS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* EM FEIJÃO

BARBOZA, Lílian Fernandes¹; MOURA, Andréa Bittencourt²; CORRÊA, Bianca Obes³; LUDWIG, Juliane⁴

Universidade Federal de Pelotas – FAEM/UFPel – Caixa Postal 354 – CEP: 96010-300

¹Graduanda Bolsista PIBIC/CNPq; ² Deptº de Fitossanidade

³Doutoranda Bolsista CAPES; ⁴Doutoranda Bolsista CNPq. lilikagronomia@yahoo.com.br

1- INTRODUÇÃO

Dentre as principais moléstias associadas à cultura do feijão no Brasil, o Crestamento bacteriano comum (CBC) incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, pode ocasionar perdas que variam de 38 a 45%, devido principalmente à redução da eficiência fotossintética, ocasionando, assim, a diminuição na produção de grãos [12].

O CBC ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de feijão do país, principalmente na estação de cultivo das “águas”. Sob temperaturas superiores a 28°C é observada uma maior severidade da doença [10]. O controle desta doença no feijoeiro envolve a adoção conjunta de várias práticas culturais como o uso de sementes saudáveis, rotação de culturas por 2 a 3 anos, aração profunda, controle de plantas daninhas e a incorporação dos restos culturais ao solo. Além destes procedimentos, recomenda-se o emprego de cultivares com um grau adequado de resistência ao CBC [6,10], pois o controle químico geralmente é ineficiente.

Em função das dificuldades de controle do crestamento, o biocontrole é visto como uma tecnologia viável, principalmente quando se sabe que alguns biocontroladores apresentam amplo espectro de ação contra doenças associadas a diversas culturas.

O presente trabalho objetivou a caracterização biológica de sete isolados bacterianos biocontroladores de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* [13] quanto a possíveis mecanismos de ação.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados bacterianos utilizados neste experimento pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas. Foi avaliada a capacidade de produção de sideróforos, de amônia e de algumas enzimas a partir dos isolados DFs093 (*Bacillus cereus*), DFs513 (*Pseudomonas veronii*), DFs769 (*Bacillus cereus*), DFs842 e DFs831 (*Pseudomonas* sp.), DFs843 e DFs912 (*Rhodococcus fascians*) repicados em substratos compatíveis para cada teste. As enzimas analisadas foram: quitinases, proteases, fosfatases e lipases.

2.1 - Produção de enzimas

a) Quitinases

Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura cuja única fonte de carbono foi a quitina, sendo logo após incubados à 28°C por 14 dias. As avaliações foram baseadas na presença ou não de halo translúcido, ao redor da colônia bacteriana, indicativo da produção de quitinase [1].

b) Proteases

As bactérias foram repicadas para tubos contendo meio de cultura Leite de Litmus® e, logo após, incubadas a 28°C pelo período de 14 dias. A avaliação foi realizada pela verificação da hidrólise do leite através da ocorrência ou não de alteração do meio leitoso para translúcido [11], sendo esta alteração considerada como resultado positivo.

Para avaliar a capacidade de hidrólise de gelatina, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio de gelatina a 15% [7] e incubadas a 28°C durante 10 dias. As avaliações foram realizadas após o 2º, 4º, 7º e 10º dia de incubação, colocando-se os tubos em geladeira pelo período de 30 minutos. Foram consideradas reações positivas, aquelas onde o meio manteve-se sob forma líquida e, negativas, aquelas em que meio tornou-se sólido.

c) Fosfatases

Para avaliar a solubilização de fosfatos, os isolados foram repicados para meio de cultura 1/10 TSA acrescido de CaHPO_4 . O precipitado de CaHPO_4 resultou de 50 mL da solução de K_2HPO_4 0,57 M e de 100 mL da solução de CaCl_2 0,90 M adicionados a 850 mL de 1/10 TSA. Fez-se ajuste do pH para 7,0. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias. A avaliação da atividade positiva baseou-se na presença de halo claro de solubilização do fosfato ao redor da colônia bacteriana.

d) Lipases

O primeiro método constou da repicagem dos isolados para meio Agar Nutriente adicionado com solução de gema de ovo a 40% e incubados a 28°C por 7 dias [11]. A avaliação positiva foi baseada na presença de um halo de degradação presente no meio.

Utilizando-se outra metodologia, os isolados foram repicados para meio de cultura de Tween 80 [4] e, a seguir, incubadas a 28°C por 7 dias. Avaliou-se o desenvolvimento de um precipitado branco – leitoso ao redor das colônias, o que indicou a capacidade do isolado em hidrolisar o lipídio Tween 80.

2.2 - Produção de Sideróforos

Os isolados foram repicados para meio líquido B de King [5] (15ml) com e sem a suplementação de 100µL de sulfato ferroso (Fe_2SO_4 -1%), sendo os mesmos incubados sob agitação a 28°C por 96 horas. Após este período, foram retirados 1000 µL, os quais foram centrifugados a 16000g por 20 minutos. Logo, foram retirados 400 µL do sobrenadante e adicionado a esta mesma suspensão, 400 µL de cromo azurol S (CAS). A alteração da coloração do meio para amarelo-avermelhado, é indicativo da produção de sideróforos [1].

2.3 - Produção de Amônia

Os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio caldo de peptona e incubados a 28°C por 5 dias. Após este período adicionou-se 1mL do reagente de Nessler [7]. A avaliação positiva da produção de amônia pelos isolados bacterianos foi verificada pela presença de um precipitado amarelo-alaranjado.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para caracterização biológica dos mecanismos de ação dos sete isolados bacterianos, observou-se que todos apresentaram alguma atividade relacionada ao controle biológico e à promoção do crescimento vegetal (Tabela 1), fato que expressa a importância do uso de agentes biocontroladores no controle de doenças de plantas.

Tabela 1 – Reações positivas e negativas de características biológicas de sete isolados biocontroladores de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Isolados	Quit.	Sidf.	Fosf.	Lipases		Proteases		Am.
				Lecit.	Tw.	L.Lit.	Gel.	
DFs093	-	-	-	+	-	+	+	+
DFs513	-	+	-	-	-	+	+	+
DFs769	+	-	-	+	-	+	-	+
DFs831	-	-	-	+	-	+	-	+
DFs842	-	+	-	+	+	+	-	+
DFs843	-	-	-	+	-	-	-	+
DFs912	-	+	-	-	+	-	-	+

+ = reação positiva; - = reação negativa; Quit.=Quitina; Sidf.=Sideróforos; Fosf.=Solubilização de fosfato; Lecit.=Lecitina; Tw.=Hidrólise de **Tween**; L. Lit= Leite Litmus®; Gel.=Hidrólise de gelatina; Am.= Produção de Amônia.

Somente o isolado DFs769 apresentou capacidade para produzir enzimas que degradam a quitina presente no meio de cultura. Para a produção de enzimas proteolíticas cinco dos sete isolados apresentaram habilidade para esta finalidade. Destes, destacaram-se DFs093 e DFs513, que apresentaram atividade para ambos os substratos avaliados.

Com relação à produção de lipases, destaque para o isolado DFs842 que demonstrou potencial de atividade enzimática sobre o meio de lecitina e de Tween. Já para produção de fosfatases, nenhum dos isolados produziu este grupo de enzimas entre os biocontroladores.

No entanto, na produção de sideróforos observou-se que apenas três isolados bacterianos, o correspondente a 43% do total dos isolados testados (DFs513, DFs842 e DFs912), foram capazes de produzir este composto, de importância tanto para o biocontrole, quanto para promoção do crescimento vegetal [8].

Na produção de amônia verificou-se que 100% dos isolados produziram este composto, que pode participar no controle de fitopatógenos, causando a morte destes microrganismos por ação direta sobre organismo alvo, bem como podem induzir resistência das plantas contra a infecção destes [2].

Assim, nota-se que os isolados apresentaram diversidade de atividades enzimáticas, o que indica que estes antagonistas apresentam potencial no controle de outras doenças e pragas como insetos e fitonematóides, onde enzimas como quitinase e lipase, por exemplo, afetam o ciclo de vida dos respectivos agentes causais.

4- CONCLUSÃO

Todos os isolados destacaram-se por apresentar diversidade de atividades enzimáticas, bem como, capacidade para produção de sideróforos, todos estes, compostos importantes para o biocontrole e promoção do crescimento vegetal, por este motivo, podem ser utilizados em programas de controle biológico para diferentes doenças do feijão, com potencial para uso em combinações entre eles, bem como usados isoladamente.

5- BIBLIOGRAFIA

- [1] CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal.** (Embrapa Soja. Documentos, 139). Londrina: Embrapa soja, 36p. 1999.
- [2] DE MEYER G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopathology**, v.87, p.588-593, 1997.
- [3] DÍAZ, C. G.; BASSANEZI, R. B.; GODOY, C. V.; LOPES, D. B.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.1, p. 71-76, 2001.
- [4] FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. **Plant Bacterial Diseases.** Australia: Academic Press Journal of Laboratorial Clinical, 1983. 393 p.
- [5] KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratorial and Clinical Medicine**, v.44, p.301-307, 1954.
- [6] KOBAYASTI, L; SOUZA, R. M.; SANTOS, JOÃO BOSCO dos. Avaliação de cultivares e linhagens de feijoeiro quanto à reação foliar e de vagens de feijão à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.23, n.1, p.40-47, 1999.
- [7] MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p. 369-409, 1993.
- [8] OLIVEIRA, A. L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Documentos, 161), ago, 2003.
- [9] RAVA, C. A. Patogenicidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 19, n.4, p. 445-448, 1984.
- [10] SAETTLER, A.W. Bacteriosis comum. In: PASTORCORRALES; SCHWARTZ, H.F. **Problemas de producción del frijol em los trópicos.** Cali:CIAT, cap.11, p.303-329 , 1994.
- [11] SHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. St. Paul: **The American Phytopathology Society**, 2001. 373 p.
- [12] VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do feijoeiro.** Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1988. 231 p.
- [13] ZANATTA, Z. G. C. N. **Potencial de bactérias para biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.** 2004. f. 67. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. RS.