



**Universidade de Brasília- UnB  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Fitopatologia**

**Bactérias Extremófilas Facultativas: efeito na promoção de  
crescimento de plantas de tomate e na supressão de *Ralstonia  
solanacearum***

**Adriana Magali de F.A. Rezende**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília, como  
requisito parcial à obtenção do grau  
de Doutor em Fitopatologia.**

**Orientador: Prof. Carlos Hidemi  
Uesugi**

**Brasília- DF  
Abril 2010**

**Trabalho de tese realizado junto ao Departamento de Fitopatologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do Professor Carlos Hidemi Uesugi, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

**Aprovado por:**

---

**Prof. Dr. Carlos Hidemi Uesugi (Orientador)**

---

**Prof. Dr. Andrew Macrae**

---

**Prof. Dr. Ricardo Henrique Kruger**

---

**Prof. Dr. Robert Neil Gerard Mille**

---

**Dr. Carlos Alberto Lopes**

*Aos meus pais  
Antônio e Ana  
Aos meus irmãos Antônio Jr. e Ana Cristina  
A meu esposo Ícaro e minha filha Hadassa  
Com todo amor  
Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

---

A Deus pelo seu imenso amor e infinita graça. Por tantos sonhos realizados. Obrigada Pai! Sem Ti eu não teria chegado até aqui.

Ao professor e orientador Carlos H. Uesugi pela paciência, atenção e confiança em transmitir todos os seus conhecimentos para a concretização desse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos os ensinamentos que serão levados por toda a vida.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia, em especial ao Arenildo por todo auxílio prestado durante toda a realização dos trabalhos.

Aos funcionários da Estação Biológica da UnB, Olinda, Francisco, Geraldo e Fábio pela grande ajuda nos experimentos, nos momentos mais difíceis.

Aos alunos da disciplina “Pesquisa em Bacteriologia” que já passaram durante todos estes anos, e que de uma forma ou de outra têm auxiliado neste trabalho, em especial aos alunos Sandro e Tamires.

A todos os colegas que fiz durante todo o tempo de curso: Èder Marques, Jaqueline, Michelle, Andressa, Dina em especial a grande e eterna amiga Ednalva Patrícia, que sempre esteve presente nos momentos de alegria e tristezas.

Ao colega Celso Tomita pela disponibilização da área para coleta das amostras de solos.

Ao Senhor Magela pela disponibilização da área de tomate, em Pípiripau, para as constantes coletas de plantas com *R. solanacearum*.

Aos professores da Banca Examinadora pelos ensinamentos, críticas construtivas e sugestões.

À minha querida família, a base de tudo na minha vida: meus pais, Antônio e Ana, razão da minha existência, com todo apoio, amor e carinho consegui concluir mais esta etapa da minha vida. Meus irmãos Antônio Júnior e Ana Cristina, pela confiança em mim depositado. Ao meu esposo e companheiro, grande amor da minha vida que tem estado ao meu lado em todos os momentos, compartilhando todas as alegrias e frustrações, me incentivando a seguir em frente e acima de tudo por fazer parte dessa grande conquista.

E finalmente não poderei de mencionar aqui uma pessoinha tão especial na minha vida que nem veio a este mundo ainda, mas que me fez amá-la de uma forma especial, minha filha Hadassa. Saiba que esperamos muito por você, foram momentos difíceis e de muita dor, mas Deus sabia exatamente o momento certo. Agora você está chegando ao momento mais lindo da nossa vida, que é a conquista de mais este prêmio.

Muito Obrigada!

## ÍNDICE

---

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
1- A Cultura do Tomateiro.....	1
2- Murcha Bacteriana do Tomateiro.....	3
2.1- Sintomatologia.....	3
2.2- Etiologia.....	4
2.3- Epidemiologia.....	7
2.4- Controle.....	8
3- Bactérias Extremófilas.....	11
Referências Bibliográficas.....	16
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS EM DIFERENTES TIPOS DE SOLOS.....</b>	<b>27</b>
Resumo.....	27
Abstract.....	28
1- Introdução.....	29
2- Material e Métodos.....	33
2.1- Localização da área e a coleta do material.....	33
2.2- Isolamento, purificação e manutenção de bactérias extremófilas facultativas.....	34
2.3- Determinação dos grupos de bactérias em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.....	35
2.4- Seleção de isolados para estudos posteriores.....	35
2.5- Identificação dos isolados.....	36
2.5.1- Caracterização bioquímica e morfológica.....	36

2.5.2- Seqüenciamento e filogenia dos isolados baseada em sequências do gene 16S DNAr.....	36
3- Resultados.....	38
3.1- Isolamento de bactérias extremófilas facultativas.....	38
3.2- Determinação dos grupos de bactérias em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.....	40
3.3- Isolados selecionados para estudos posteriores.....	43
3.4- Caracterização bioquímica e morfológica.....	45
3.5- Seqüenciamento e filogenia dos isolados baseada em sequências do gene 16S DNAr.....	48
4- Discussão.....	51
5- Conclusões.....	54
Referências Bibliográficas.....	56

**CAPÍTULO 2- BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS: EFEITO NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.).....**

<b>Resumo.....</b>	<b>64</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>65</b>
1- Introdução.....	66
2- Material e Métodos.....	69
2.1- Preparo das bandejas.....	70
2.2- Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.....	70
2.3- Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.....	71
2.4- Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos isolados bacterianos altura das plantas de tomate.....	72
2.5- Determinações da matéria fresca e seca das plantas de tomate .....	73
2.6- Bioensaio de solubilização de fosfatos com os isolados bacterianos providos de condições extremas.....	73
3- Resultados.....	74
3.1- Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na altura das plantas de tomate .....	74

3.2- Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na altura das plantas de tomate .....	77
3.3- Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos isolados bacterianos na altura das plantas de tomate .....	80
3.4- Determinações da matéria fresca e seca das plantas de tomate .....	82
3.5- Bioensaio de solubilização de fosfatos com os isolados bacterianos providos de condições extremas.....	86
4- Discussão.....	86
5- Conclusões.....	90
Referências Bibliográficas.....	92

**CAPÍTULO 3- BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS: EFEITO NA SUPRESSÃO DE *Ralstonia solanacearum*, EM PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.).....**

<b>Resumo.....</b>	<b>98</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>99</b>
1- Introdução.....	100
2- Material e Métodos.....	103
2.1- Detecção de atividade <i>in vitro</i> das bactérias extremófilas facultativas sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	104
2.2- Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos, procedentes de condições extremas, na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	105
2.2.1- Inoculação de <i>R. solanacearum</i> .....	105
2.2.2- Avaliações.....	106
2.3- Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	106
2.4- Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos isolados bacterianos na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	107
3- Resultados.....	108
3.1- Detecção de atividade <i>in vitro</i> das bactérias extremófilas facultativas sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	108
3.2- Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	111



3.3- Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	115
3.4- Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos isolados bacterianos na supressão de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	119
4- Discussão.....	123
5- Conclusões.....	126
Referências Bibliográficas.....	128
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	133
<b>ANEXOS</b> .....	135

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Página

<b>Tabela 1.1-</b> Caracterização química dos solos cultivados (SC) e solos não cultivados (SNC) .....	34
<b>Tabela 1.2-</b> Isolados bacterianos utilizados no estudo.....	39
<b>Tabela 1.3-</b> Isolados selecionados em relação ao crescimento bacteriano, com base nas características em comum de temperatura, pH e salinidade .....	44
<b>Tabela 1.4-</b> Caracterização bioquímica e morfológica dos isolados obtidos de condições extremas .....	46
<b>Tabela 2.1-</b> Isolados bacterianos, de condições extremas, utilizados no presente estudo.....	69
<b>Tabela 2.2-</b> Médias da altura das plantas, obtidas com 28 DAT, realizadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade .....	77
<b>Tabela 2.3-</b> Efeito dos isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de tomateiro, sobre o peso da matéria fresca e seca, nos três tipos de experimentos, avaliados aos 28 e 36 DAT, no sistema Composto Orgânico .....	84
<b>Tabela 2.4-</b> Efeito dos isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de tomateiro, sobre o peso da matéria fresca e seca, nos três tipos de experimentos, avaliados aos 28 e 36 DAT, no sistema Bokashi .....	85
<b>Tabela 3.1-</b> Avaliação do potencial de inibição do crescimento de <i>Ralstonia solanacearum</i> através do halo inibitório .....	110
<b>Tabela 3.2-</b> Avaliação da altura das plantas de tomate, com 21 dias após a inoculação de <i>Ralstonia solanacearum</i> , e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em diferentes sistemas orgânicos, no experimento individual .....	113
<b>Tabela 3.3-</b> Avaliação da altura das plantas de tomate, com 21 dias após a inoculação de <i>Ralstonia solanacearum</i> , e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em diferentes sistemas orgânicos, no experimento combinado de dois .....	117
<b>Tabela 3.4-</b> Avaliação da altura das plantas de tomate, com 21 dias após a inoculação de <i>Ralstonia solanacearum</i> , e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em diferentes sistemas orgânicos, no experimento combinado de três e todos simultaneamente.....	121

**Figura 1.1-** Percentagem de isolados com crescimento bacteriano, obtidos de amostras de solos cultivados, em diferentes condições de: (A) temperatura, (B e C) pH e (D) NaCl ..... 41

**Figura 1.2-** Percentagem de isolados com crescimento bacteriano, obtidos de amostras de solos não cultivados, em diferentes condições de: (A) temperatura, (B e C) pH e (D) NaCl ..... 42

**Figura 1.3-** Análise de Componentes Principais (PCA) baseado nos perfis bioquímicos dos isolados analisados. Os valores indicam a percentagem da variância explicada nos eixos ..... 48

**Figura 1.4-** Filogenia dos isolados analisados no presente estudo. A filogenia é baseada na sequência parcial, sendo o alinhamento feito em 1377 pares de base do gene 16S DNAr. As sequências dos isolados foram avaliadas em relação à similaridade com as sequências presentes em banco de dados e foram correlacionadas com base no agrupamento por Neighbor-joining. Sequências de cianobactérias foram utilizadas como grupo externo, para enraizamento da árvore filogenética. Os valores de bootstrap também são apresentados, sendo calculados por 1000 subamostragens no grupo de sequências ..... 50

**Figura 2.1 -** Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento individual, com avaliação semanal, no sistema Composto Orgânico. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.)..... 75

**Figura 2.2-** Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento individual, com avaliação semanal, no sistema Bokashi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).....76

**Figura 2.3 -** Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 2, com avaliação semanal, no sistema Composto Orgânico. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.)..... 78

**Figura 2.4** - Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 2, com avaliação semanal, no sistema Bokashi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.)..... 79

**Figura 2.5** - Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 3 e todos, com avaliação semanal, no sistema Composto Orgânico. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).....81

**Figura 2.6** - Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na promoção do crescimento das plantas de tomate, experimento combinado de 3 e todos, com avaliação semanal, no sistema Bokashi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.)..... 82

**Figura 3.1-** Esquema explicativo do procedimento para execução do teste de antibiose das bactérias extremófilas facultativas sobre *Ralstonia solanacearum* ..... 104

**Figura 3.2-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento individual, no sistema Bokashi, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%) ..... 112

**Figura 3.3-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento individual, no sistema Composto Orgânico, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%) .....114

**Figura 3.4-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de dois, no sistema Bokashi, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%) .....115

**Figura 3.5-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de dois, no sistema Composto Orgânico, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%) .....118

**Figura 3.6-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de três e com todos isolados simultaneamente, no sistema Bokashi, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os

tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%) ..... 120

**Figura 3.7-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de três e com todos isolados simultaneamente, no sistema Composto Orgânico, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%) ..... 122

## RESUMO

---

O tomateiro comum (*Solanum lycopersicum* L.) é uma olerícola de grande importância econômica e social, se destacando no Brasil, pelas extensas áreas agrícolas cultivadas. O Brasil é o sexto maior produtor de tomate no mundo. No entanto, a murcha bacteriana, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi está entre as doenças de maior importância e de difícil controle, não existindo ainda medidas adequadas que possam ser recomendadas. Com objetivo de determinar um controle biológico eficaz, comparado às outras bactérias antagonistas e com comportamentos semelhantes contra muitos fitopatógenos, foi escolhido o estudo com bactérias extremófilas facultativas para verificar seu efeito na promoção do crescimento das plantas de tomate e ao mesmo tempo estudar a supressão da murcha bacteriana. Foram coletadas diferentes amostras de solos, no município de Brazlândia, em Brasília, DF, Brasil. Obteve-se um total de trinta e oito isolados os quais foram submetidos aos testes de temperaturas (45, 55, 65 e 75 °C), pH (3, 4, 5, 9, 10 e 11) e salinidade (5, 10 e 15 % de NaCl). Onze isolados foram selecionados para caracterização bioquímica e identificação baseada nas sequências 16S DNAr. Verificou-se que em todas as amostras de solos determinaram-se quatro grupos de bactérias, sendo que em cada um observou a presença de isolados crescendo nas condições mais extremas. Dos onze isolados selecionados, todas as bactérias foram Gram negativa, podendo separá-los em três grupos distintos, com base nas reações positivas para as características bioquímicas: o primeiro grupo formado, com base no teste oxidação/fermentação da glicose, obteve-se sete isolados pertencendo à família Enterobacteriaceae; o segundo grupo com base no crescimento em meio King-B, obteve-se dois isolados de *Pseudomonas* sp.; e o terceiro grupo não relacionados taxonomicamente, com dois isolados, *Giesbergeria* sp. e *Chryseobacterium* sp. Estes onze isolados selecionados e identificados foram avaliados, em casa de vegetação, no estudo da promoção do crescimento das plantas de tomate. Foram montados três experimentos: (1) com aplicação individual, (2) com combinação de dois e (3) com combinação de três e com todos isolados simultaneamente, com dois sistemas orgânicos, composto (CO) e bokashi (BK). A aplicação individual dos isolados mostrou ser mais eficiente na promoção do crescimento das plantas, o isolado UnB 1327, no sistema CO apresentou maiores incrementos para altura, peso matéria fresca e seca de 233,9%, 55,9% e 24,2%, respectivamente maiores que a testemunha (100%). No

estudo da supressão de *R. solanacearum*, no experimento 1, os isolados UnB 1321 no sistema BK e UnB 1326 e UnB 1322 no sistema CO, mostraram ser eficientes na supressão da bacteriose, destacando-se com 100% de controle. O experimento 2, mostrou ser mais eficiente na supressão da murcha bacteriana, independentemente do tipo de sistemas avaliados. No experimento 3, no sistema BK, a testemunha diferenciou significativamente de todos os tratamentos, inclusive da combinação UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 apresentando 87% e 27%, respectivamente, de plantas mortas. No sistema CO, houve alta percentagem da doença em todos os tratamentos, no entanto nenhum tratamento diferenciou da testemunha que apresentou 60% de plantas mortas.

**Palavras chaves:** bactérias termófilas, bactérias alcalófilas, bactérias acidófilas, bactérias halófilas, promoção do crescimento, *Solanum lycopersicum*, *Ralstonia solanacearum*, supressão de doença.

## ABSTRACT

---

The common tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a crop of great economic importance and social, standing out in Brazil due to largest agricultural areas cultivated. Brazil is the sixth largest tomato producer in the world. However, bacterial wilt caused by the bacterium *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi is one of the most important and difficult to control disease, with no further appropriate measures as may be recommended. This work aimed to establish an effective biological control, compared to other antagonists bacteria and with similar behavior for many plant pathogens, was chosen the study with facultative extremophiles bacteria for its effect on promoting growth of tomato plants and the suppression of bacterial wilt. To this end, several soil samples were collected in the municipality of Brazlândia, near Brasília, Federal District, Brazil. A total of 38 isolates were submitted to temperature tests (45, 55, 65 and 75 °C), pH tests (3, 4, 5, 9, 10 and 11) and salinity tests (5, 10 and 15 % of NaCl). Eleven isolates were selected for biochemical characterization and identification based on the 16S DNAr sequences. It was confirmed that in all the soil samples four groups of bacteria were categorized, and in each one the presence of isolates growing in highly extreme conditions was observed. Of the 11 selected isolates, all the bacteria were Gram-negative, and these could be separated into three distinct groups, based on their positive reactions to biochemical characteristics. From the first group, based on the glucose oxidation/fermentation test, we obtained seven isolates belonging to the family Enterobacteriaceae; from the second group, based on growth in King-B medium, we obtained two isolates of *Pseudomonas* sp.; the third, taxonomically unrelated group, showed two isolates, *Giesbergeria* sp. and *Chryseobacterium* sp. These eleven isolates identified were selected and evaluated in a greenhouse in the study of growth promotion of tomato plants. Three experiments were carried out: (1) with individual application, (2) with a combination of two and (3) with a combination of three and all isolates simultaneously, with both systems, compound (OC) and bokashi (BK). Applying individual isolate was more efficient in promoting plant growth, the isolate UnB 1327, on conventional treatment showed more increase for height, fresh and dry weight of 233,9%, 55,9% and 24,2% respectively higher than the control 2 (100%). In the study of suppression of *R. solanacearum*, in experiment 1, isolates UnB 1321 in the BK system and UnB 1326 and UnB 1322 in the CO system were seen to be efficient in the suppression of bacteriosis, at 100% difference from the control. Experiment 2 was



efficient in suppressing bacterial wilt, independently of the type of system being evaluated. In experiment 3, in the BK system, the control was significantly different from all the treatments, including from the UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 combination, presenting 87% and 27% dead plants, respectively. In the CO system, there was a high percentage of the disease in all treatments, but no treatment differed from the control, which presented 60% dead plants.

**Keywords:** thermophilic bacteria, alkaliphilic bacteria, acidophilic bacteria, halophilic bacteria, growth promotion, *Solanum lycopersicum*, *Ralstonia solanacearum*, disease suppression.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 1- A Cultura do Tomateiro

O tomateiro comum (*Solanum lycopersicum* L.), pertencente à família Solanaceae, teve como centro de origem a região Andina, desde o Equador, passando pela Colômbia, Peru, Bolívia, até ao norte do Chile. Porém, a sua domesticação ocorreu no México, sendo cultivado e consumido nas mais variadas formas (Alvarenga, 2004a). É uma espécie cosmopolita, amplamente disseminada no mundo, sendo China, Estados Unidos e Itália os maiores produtores (Trebesch, 2008).

O tomateiro é uma cultura olerícola de grande importância econômica e social, pela produção e geração de empregos; visto que são quase quatro milhões de hortas cultivadas com esta espécie (Makishima & Melo, 2004). O Brasil apresenta uma extensa área agrícola e é o sexto maior produtor de tomate do mundo (Trebesch, 2008), com uma área plantada de 61.025 ha e uma produção anual de 3,8 milhões de toneladas (IBGE, 2009). As técnicas de irrigação, o uso intensivo de insumos e a introdução de híbridos mais produtivos e com menores perdas na pós-colheita foram alguns dos principais fatores que contribuíram para o aumento da produtividade do tomate nacional, obtendo um rendimento médio de aproximadamente 58 t/ha (Carvalho & Pagliuca, 2007). Embora cultivado em todos os estados, os principais produtores são Goiás (24%), São Paulo (21%), Minas Gerais (18%), Rio de Janeiro (6%) e cada um dos estados como Bahia, Pernambuco e Paraná com (5%), os outros somam (16%) (Chaves, 2006).

O tomateiro é uma planta perene de porte arbustivo, sendo cultivada anualmente; podendo desenvolver-se de forma rasteira, semi-ereta ou ereta. As plantas se desenvolvem bem em amplo espectro de latitude, tipos de solos, temperaturas e métodos de cultivo, sendo o ambiente quente, com boa iluminação e drenagem os mais adequados para o seu cultivo (Alvarenga, 2004a).

O cultivo do tomateiro pode ser realizado pelo sistema tutorado, para as plantas que apresentam crescimento indeterminado ou semi-determinado, cujos frutos são destinados ao comércio natural, ou seja, mercado para mesa. E o sistema não tutorado, também conhecido como cultivo rasteiro é utilizado para cultivares de crescimento determinado e a produção é destinada para industrialização (Makishima & Melo, 2004). Segundo Peixoto (2003) 70% da produção nacional de tomate é destinado ao mercado

fresco, em saladas, e o restante são para o processamento de estratos, molhos (ketchups), sucos e outros derivados.

A produção de tomates para o consumo *in natura* no Brasil sofreu grandes transformações tecnológicas, nesta última década. Dentre elas, a utilização de sementes híbridas de cultivares que produzem frutos do tipo “longa vida” foi sem dúvida uma das mais importantes. O fruto de tomate das cultivares tradicional possui uma vida bem curta após a colheita; enquanto que os “longa vida” possui uma vida pós-colheita mais prolongada, permanecendo firmes por um maior período de tempo (Alvarenga, 2004b; Della Vecchia & Koch, 2000). Didaticamente, as cultivares destinadas ao consumo *in natura* podem ser divididas, em cinco grupos: Santa Cruz, Salada ou Caqui, Saladinha, Saladete ou Italiano, e o Cereja (Alvarenga, 2004b).

A cultura do tomate está sujeita a diversos problemas fitossanitários, entre os quais, as doenças causadas por fungos, vírus, nematóides e bactérias. Entre os fungos de importância no Brasil destacam-se: *Phytophthora infestans* (requeima), *Alternaria solani* (pinta-preta), *Septoria lycopersici* (septoriose), *Sclerotinia sclerotiorum* (podridão-de-esclerotínia), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (murcha-de-fusário), *Verticillium dahliae* (murcha-de-verticílio), *Sclerotium rolfsii* (murcha-de-esclerócio), *Oidium lycopersici* e *Oidiopsis sicula* (oídio) (Lopes et al., 2005b; Kurozawa & Pavan, 2005). Entre os vírus já relatados no Brasil destacam-se: *Tomato yellow top virus*-ToYTV (topo-amarelo), *Tomato mosaic virus*- ToMV (mosaico comum), *Tomato spotted wilt virus*- TSWV e outros vírus do gênero *Tospovirus*, causam a doença vira-cabeça; *Potato virus Y*-PVY (risca-do-tomateiro ou mosaico Y); vírus do gênero *Begomovirus* (mosaico-dourado) (Kurozawa & Pavan, 2005; Nagata et al., 2005). As espécies de nematóides que causam grandes perdas na tomaticultura no Brasil estão *Meloidogyne incognita* (raça 1, 2, 3 e 4), *M. javanica* e *M. arenaria* (Charchar & Lopes, 2005).

Entre as fitobacterioses com maior ocorrência no Brasil, destacam-se: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cancro-bacteriano), *Xanthomonas* spp. (mancha-bacteriana), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (pinta-bacteriana), *Erwinia* spp. (talo-oco ou podridão-mole), e *Ralstonia solanacearum* (murcha bacteriana) (Kurozawa & Pavan, 2005; Lopes & Quezado-Duval, 2005a; Lopes et al., 2000). Segundo Malavolta Júnior & Rodrigues Neto (1991) as fitobactérias são fator limitante à exploração econômica desta solanácea.

Entre todas as doenças do tomateiro, a murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* é considerada uma das principais doenças, não somente no tomateiro, mas também em outras solanáceas em regiões tropicais e subtropicais. Ataca centenas de espécies de plantas de mais de cinquenta famílias botânicas (Lopes & Quezado-Duval 2005a). Entre as principais culturas afetadas estão as solanáceas: a batata, o tomate, a berinjela, o fumo e o pimentão, e não solanáceas, como amendoim, banana, feijão caupi, cajú, mamão, gengibre (Guo et al., 2004; Vanitha et al., 2009; Xue et al., 2009) e eucalipto (Alfenas et al., 2006).

## **2- Murcha Bacteriana do Tomateiro**

No Brasil, a primeira observação sobre a ocorrência da murcha bacteriana foi feita por Von Parserval em 1922 (Lopes et al., 1993) nas culturas de fumo e batata no Rio Grande do Sul. A sua distribuição é muito ampla, assim como a diversidade de hospedeiros, sendo difícil determinar a sua origem (Ribeiro, 1993).

Lopes & Quezado-Duval (2005a) relatam que no Brasil, a doença é fator limitante à produção de tomate de mesa no verão chuvoso nas regiões Sudeste e Centro Oeste e na maior parte do ano nas regiões Norte e Nordeste, impedindo seu plantio em muitas áreas; em outras regiões brasileiras sua ocorrência é comum, principalmente nos meses mais quentes do ano (Kurozawa & Pavan, 2005).

### **2.1- Sintomatologia**

O primeiro sintoma da doença é a murcha das folhas na parte superior da planta, culminando com a murcha geral das plantas. Estas morrem sem que haja destruição da clorofila, visto que a evolução dos sintomas é rápida, ocasionando a morte da planta com dois a quatro dias após o aparecimento dos sintomas iniciais (Kurozawa & Pavan, 2005). Tais sintomas são mais evidentes no início da frutificação sob temperatura e alta umidade (Vale et al., 2004).

A bactéria é capaz de penetrar no hospedeiro por qualquer ferimento, sendo a penetração pela raiz a mais importante. Após a penetração, a bactéria coloniza os vasos lenhosos, obstruindo-os em grande extensão, dificultando o fluxo de água (Kurozawa & Pavan, 2005); por isto que no início da manifestação dos sintomas os folíolos tornam

murchos, podendo voltar à condição normal de turgidez durante a noite ou nas horas mais frias do dia, dando uma falsa recuperação das plantas (Lopes & Quezado-Duval, 2005a).

Na base do caule é comum observar descoloração vascular de cor marrom. A diagnose pode ser confirmada com o “teste do copo”. Corta-se uma porção da base do caule, após ter sido bem lavada, é mergulhada em um copo transparente. O teste positivo quando um fluxo leitoso escorre, após alguns minutos da extremidade do caule em direção ao fundo do copo (Lopes & Santos, 1994; Lopes et al., 2000; Vale et al., 2004; Kurosawa & Pavan, 2005; Lopes & Quezado-Duval, 2005a). De acordo com Lopes & Quezado-Soares (2000) outros sintomas também podem ser observados quando as condições ambientais não são favoráveis à doenças, como o nanismo da planta, amarelecimento e epinastia das folhas e a formação de raízes adventícias.

## 2.2- Etiologia

A espécie *R. solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al. 1995 é uma bactéria Gram negativa, aeróbia, bastonetiforme, medindo 0,5-0,7 a 1,5-2,5  $\mu\text{m}$ , que apresenta um ou mais flagelos polares, pertencente à família Burkholderiaceae, ordem Burkholderiales, classe Betaproteobacteria, do filo Proteobacteria (Garrity et al., 2005). Conforme Palleroni (1984) a primeira descrição do gênero como *Pseudomonas* foi realizado por Migula em 1894, enquanto Smith, em 1896, a identificou pela primeira vez como *Bacillus solanacearum*, sendo reclassificada em 1914, como *P. solanacearum* (basinômio: *B. solanacearum*) (Smith, 1896). Com advento das modernas tecnologias em métodos de biologia molecular, o gênero *Pseudomonas* foi dividido em cinco grupos de espécies, onde a espécie *P. solanacearum*, pertencente ao grupo das não fluorescentes foi considerada como pertencente ao grupo II de homologia de rRNA do gênero *Pseudomonas* (Palleroni et al., 1973). Em 1992, as espécies pertencentes a este grupo foram transferidas para o gênero *Burkholderia*, passando a espécie a ser chamada de *B. solanacearum* (Yabuuchi et al., 1992). Três anos depois, baseados em estudos das características fenotípicas, na análise de lipídio celular e de ácidos graxos, e na análise filogenética da sequência de nucleotídeos de rDNA 16S e da homologia rRNA-DNA passou a ser chamada de *R. solanacearum* (Smith, 1896) (Yabuuchi et al., 1995).

A bactéria *R. solanacearum* apresenta grande variabilidade genética; nas subespécies seus isolados são classificados em cinco raças, de acordo com o grupo de

espécies hospedeiras (Buddenhagen et al. 1962); enquanto que a proposição biovares de acordo com as características bioquímicas e nutricionais (Hayward, 1964). A raça 1 é patogênica a um amplo número de hospedeiras, incluindo fumo, tomateiro e certas bananeiras diplóides (grupo BB ou AA), em regiões tropicais e subtropicais. A raça 2 infecta banana (grupo AAA, AAB e ABB), helicônia e alguns hospedeiros perenes, estando limitada aos trópicos americanos e agora difundida na Ásia. A raça 3 é patogênica a batata e tomate, encontrada nas regiões tropicais e subtropicais e também gerânio nos EUA. A raça 4 é patogênica ao gengibre, nas Filipinas e a raça 5 infecta a amora, difundida na China.

Quanto à capacidade de utilizar e produzir ácido a partir de açúcares (maltose, lactose e celobiose) e de álcoois (manitol, sorbitol e ducitol), Hayward (1964, 1991) classificou-a em quatro biovares. A biovar I não utiliza e não produz ácido a partir dos açúcares e dos álcoois; a II utiliza e produz ácido apenas a partir dos açúcares; a III utiliza e produz ácido a partir dos açúcares e dos álcoois; a IV utiliza e produz ácido a partir dos álcoois. No Brasil, somente isolados das biovares I e III, ambos pertencentes à raça 1, foram encontrado infectando o tomateiro sob condições naturais (Lopes & Quezado-Soares, 2000).

Vários métodos baseados na análise genômica têm sido empregados para avaliação da diversidade genética em *R. solanacearum*, entre os quais destacam-se: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); análise do DNA ribossomal e do gene *hrp*; RC- PFGE (rare-cutting restriction endonucleases Pulsed-field gel electrophoresis); AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e rep-PCR (repetitive-PCR) (Smith et al., 1995; Jaunet & Wang, 1999; Poussier et al., 1999; Martins, 2000; Yu et al., 2003; Horita & Tsuchiya, 2001; Horita et al., 2005; Costa et al., 2007).

Embora as classificações em raças e biovares tenham sido úteis nos últimos anos, têm a inconveniência de não serem consistentes, uma vez que se baseiam em características fenotípicas (Silveira et al., 2005). Estudos usando homologia de DNA-DNA revelaram que *R. solanacearum* não é uma espécie única e uma nova classificação a nível molecular se tornou necessária (Palleroni & Doudoroff, 1971). A bactéria foi então classificada como um complexo específico, sendo definido por um grupo de isolados muito proximamente aparentados cujos membros individualmente podem ser de mais de uma espécie. Este termo foi aplicado primeiramente por Gillings & Fahy (1994) para refletir a variação genotípica e fenotípica da espécie.

Fegan & Prior (2005) propôs uma nova classificação genética baseada em quatro níveis taxonômicos. Nessa nova proposta o termo “filotipo”, que é identificado por PCR multiplex baseado na região ITS (intergenic transcribed sequence) do cromossomo entre os genes de RNA ribossomal 16S e 23S, são usados para designar grupos maiores no nível de subespécies. O termo “sequevar”, que é identificado pela análise de sequência de genes de endoglucanases (enzima que tem um papel importante na patogenicidade da bactéria), é usado para designar grupos infra-subespecíficos. A classificação em filotipos se baseia na variação do tamanho da sequência ITS. O filotipo I é originado da Ásia, o filotipo II nas Américas, o filotipo III na África e os pertencentes ao filotipo IV originados na Indonésia, o que parece ser o centro da diversidade. Assim cada filotipo é composto por um número de sequevares. Uma sequevar (Sequence variant) é definida como um grupo de isolados com a maior conservação de sequências dentro da região gênica estudada (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005).

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria que apresenta mais de um tipo de colônias, sendo virulentas as colônias brancas, brilhante e consistência semiflúida; enquanto as colônias avirulentas apresentam uma coloração creme escuro e opaca. A presença de mais de uma forma de colônias dificulta a manutenção e preservação da bactéria, visto que após várias repicagens ocorre a perda da patogenicidade, permanecendo apenas a avirulenta. Este fato é comprovado por Romeiro (2001) onde menciona que algumas bactérias após sucessivas repicagens, podem permanecer viáveis, porém perdem a patogenicidade ou virulência. Takatsu & Lopes (1997) mencionam que a forma de preservação dos isolados de *R. solanacearum* têm sido um dos fatores limitantes para estudo e caracterização dos isolados dessa bactéria, devido a instabilidade e perda da virulência, em meio de preservação em água ou liofilizada. Os mesmos autores sugerem que uma preservação segura seria obtida somente em congeladores a 80 °C negativos ou em nitrogênio líquido.

A questão da bactéria *R. solanacearum* apresentar mais de um tipo de colônia, foi descrito e observado pela primeira vez por Kelman (1954) quando adicionou cloreto de trifenil-tetrazolium em meios de cultura, observou que surgiam basicamente três tipos de colônias, sendo as colônias grandes e avermelhadas as avirulentas, as avermelhadas de estreito bordo branco, moderadamente virulentas e as pequenas de centro vermelhos, as virulentas. Mais tarde comprovou que as avirulentas não tinham cápsula, ao passo que as virulentas eram sempre capsuladas (Romeiro, 2005).

### 2.3- Epidemiologia

A doença causa maiores perdas em lavouras de tomate cultivadas sob condições de alta temperatura entre 24 e 35 °C (Kurozawa & Pavan, 2005) e alta umidade do solo (Vale et al., 2004). Por isso, é limitante na região norte e parte da região nordeste do Brasil, onde essas condições ocorrem com frequência. Hayward (1991) descreve que a temperatura é o fator mais importante que afeta a interação patógeno-hospedeiro e que o aumento da temperatura ambiente para 30-35 °C durante o dia também aumenta a incidência da murcha bacteriana, mas não para todas as estirpes do patógeno. A bactéria é sensível ao dessecamento, em solos secos, as células são destruídas rapidamente, fato demonstrado por Hayward (1991) que solos expostos a 43 °C de forma contínua, por vários dias, estavam livres de patógenos.

A alta umidade do solo afeta positivamente a disseminação, a multiplicação e a colonização por bactéria, com conseqüente aumento da taxa de progresso da doença no campo (Takatsu & Lopes, 1997). Segundo Coelho Netto et al. (2004) em áreas de várzeas, muitos dos plantios de tomateiros visitados estavam abandonados em decorrência da incidência da murcha bacteriana.

A bactéria sobrevive no solo por vários anos, associado a restos de cultura e à rizosfera de inúmeras plantas e aderidas às argilas no solo, mesmo na ausência de planta hospedeira (Vale et al., 2004). Segundo Granada & Sequeira (1983) *R. solanacearum* tem baixa capacidade de sobrevivência no solo e as altas populações do patógeno estão associadas a infecções sistêmicas ou localizadas em raízes de plantas não hospedeiras ou assintomáticas, como feijão, ervilha, soja, milho e arroz. A presença da bactéria em plantas cultivadas ou daninhas pode refletir em maior ou menor densidade de inóculo inicial para a cultura do tomateiro (Lopes & Quezado-Soares, 2000). A primeira constatação da infecção da planta daninha *Melanthera discoidea* por *R. solanacearum* foi realizada por Coelho Netto et al. (2001). Segundo Coelho Netto et al. (2004) essa e outras espécies de plantas daninhas como *Solanum nigrum* (erva-moura), podem servir de reservatório do patógeno, contribuindo para manutenção da população bacteriana do solo. De acordo com Takatsu & Lopes (1997) muitas espécies de plantas cultivadas, como abobrinha, beterraba, caupi, feijoeiro, repolho e ervilha, consideradas como plantas não hospedeiras, podem manter populações elevadas de muitas estirpes das biovars 1 e 3 de *R. solanacearum*. Os mesmos autores consideram que através dos métodos de avaliação da população radicular dessa bactéria, auxiliados com as técnicas



moleculares de identificação de grupos genéticos e de clones como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified nucleases Pulsed-field gel electrophoresis), poderão ser tecnicamente possíveis fazer a identificação segura das estirpes presentes na área ou região e identificar e definir as espécies cultivadas e silvestres hospedeiras e não hospedeiras daquelas estirpes.

O principal meio de disseminação da bactéria à curta distância é a água de irrigação ou de chuva, que escorre na lavoura carreando o inóculo para partes mais baixas do campo (Lopes & Quezado-Soares, 2000). Outras formas de disseminação podem ser através do contato das raízes, por insetos que visitam a inflorescência e através de ferramentas de corte (Takatsu & Lopes, 1997), ataque de nematóide, solo aderido aos calçados dos operários, às patas de animais, aos pneus dos tratores e aos implementos agrícolas (Lopes & Quezado-Soares, 2000; Vale et al., 2004).

Materiais de propagação vegetativa como tubérculos, rizomas e mudas são os veículos mais eficientes de disseminação da bactéria a longas distâncias e para novas plantações (Takatsu & Lopes, 1997). A transmissão da bactéria através de sementes já foi comprovada em tomate (Vanitha et al., 2009; Singh, 1994) e em amendoim (Zhang et al., 1993), no entanto, ainda não foi encontrado relatos dessa bactéria em sementes no Brasil (Takatsu & Lopes, 1997). Segundo os autores provavelmente a não comprovação até agora se deva em parte ao fato das sementes de solanáceas (tomate, pimentão, berinjela e jiló) que são comercializadas no Brasil serem produzidas em regiões onde a murcha bacteriana não ocorre ou a sua incidência é pouco significativa.

#### **2.4- Controle**

O controle da murcha bacteriana é difícil devido ao grande círculo de hospedeiras do patógeno, à complexidade que envolve a sobrevivência da bactéria no solo e a alta variabilidade genética, em termos de patogenicidade e virulência (Lopes & Quezado-Soares, 2000). Não existem ainda medidas adequadas de controle que possam ser recomendadas. Contudo algumas medidas gerais podem ser aplicadas, com o intuito de reduzir a doença, tais como: rotação de culturas, preferencialmente com gramíneas como milho, arroz e pastagens, sendo de suma importância a eliminação de plantas voluntárias e espécies suscetíveis de plantas daninhas, como maria-pretinha (*Solanum americanum*), hortelã-do-campo (*Marsypianthes chamaedris*) e cheirosa (*Hyptis suaveolens*) (Quezado-Soares & Lopes, 1994); plantio em áreas onde não há histórico

de ocorrência da doença; isolamento de focos iniciais da doença; especial cuidado com a água de irrigação; boa sanidade das mudas e das plantas; controle de nematóides e insetos do solo; evitar plantios em épocas de temperatura e umidade altas; fazer a solarização do solo (Lopes & Santos, 1994; Kurozawa & Pavan, 2005; Lopes & Quezado-Soares, 2005).

A solarização é um método de desinfestação do solo que foi desenvolvido, em Israel, por Katan et al. (1976) e vem sendo utilizado em diversos países incluindo o Brasil (Katan & De Vay, 1991; Souza, 1994; Ghini & Bettiol, 1995). A técnica consiste na cobertura do solo úmido, com um filme plástico transparente, antes do plantio, preferencialmente durante o período de maior incidência de radiação solar.

A solarização objetiva controlar fitopatógenos veiculados pelo solo. A cobertura com o plástico promove aquecimento, especialmente das camadas superficiais do solo, inibindo ou eliminando organismos. Assim, parte da população de patógenos é morta em decorrência da elevação da temperatura. Os processos microbianos induzidos pela solarização contribuem para o controle de doenças, já que o aquecimento atua também sobre organismos não visados (Katan, 1981). Outros efeitos também podem ser observados após o tratamento, como o controle de plantas invasoras (Bettiol et al., 1994), maior crescimento das plantas, com maior produtividade.

O plantio em áreas livres do patógeno parece ser uma estratégia eficiente no controle da bactéria; no entanto pode apresentar algumas limitações no que diz respeito ao alto preço do arrendamento das terras virgens, além das conseqüências ambientais provocadas pelo desmatamento descontrolado (Takatsu & Lopes, 1997).

O tratamento térmico do solo é realizado por injeção de vapor com canos perfurados ou solarização, que tem o inconveniente de requerer que o solo seja mantido sem cultivo por um tempo mais prolongado, além de não eliminar o patógeno alojado em grandes profundidades; e modificar a microfauna do solo, podendo resultar no controle biológico (Lopes & Quezado-Soares, 2000). No entanto, Baptista et al. (2006, 2007) estudando o efeito da solarização e biofumigação do solo, uma técnica que consiste em fumigar o solo com brometo de metila, logo após a solarização por um período de dois, quatro e seis meses, e incorporação de cama-de-frango nas concentrações de 2 e 5%, verificaram que a solarização e biofumigação com adição de cama-de-frango, em ambas concentrações, foram eficientes na redução da incidência da murcha bacteriana do tomateiro.

Vale et al. (2004); Lopes & Quezado-Duval (2005a) mencionam que não existem cultivares com alta resistência à doença. No melhoramento genético a obtenção de cultivares resistentes é um trabalho de longo prazo, dispendioso e difícil; além disso a resistência de uma cultivar normalmente não é estável ou duradoura (Hayward, 1991). Em geral as fontes de resistência encontradas são do tipo poligênico, conferindo resistência horizontal a diversas variantes, porém sofrendo grande influência ambiental, ou seja, não se expressam sob condições de alta temperatura (Prior, 1994 citado por Lopes & Quezado-Soares, 2000). A utilização de produtos químicos pode até ser considerada uma medida bastante útil, uma estratégia rápida para o manejo da doença; no entanto nenhum produto químico eficaz está disponível para a bactéria *R. solanacearum* (Xue et al., 2009) e mesmo que os produtos estivessem sendo comercializados causariam impactos negativos ao meio ambiente.

O controle biológico é um tema que precisa ser mais explorado. É uma das estratégias mais promissoras para reduzir a incidência da doença e as perdas na produtividade causada pela bactéria; além de ser um manejo que não dependerá de produtos químicos de alto risco para o meio ambiente (Vanitha et al., 2009; Xue et al., 2009).

Vários trabalhos têm sido conduzidos “*in vitro*” e “*in vivo*” com êxitos parciais no biocontrole da murcha bacteriana do tomate. Lião (1989) estudando o isolado PP22 de *Pseudomonas putida* verificou que o mesmo inibiu o crescimento de um largo espectro de bactérias fitopatogênicas em meio de cultura, dentre os quais um isolado de *P. solanacearum*. Mariano (1989) citado por Peixoto (1997) com trabalhos “*in vivo*” visando a obtenção de biocontroladores da murcha bacteriana das solanáceas, estudou os isolados P2 e SDR2 de *P. fluorescens* e C21 de *P. marginalis* foram aplicados a plantas de tomate com 21 dias de idades cultivadas em solo natural e esterilizado dois dias antes, simultaneamente e dois dias após à inoculação com *P. solanacearum*. O isolado P2 foi indicado como melhor antagonista, embora reduzindo a severidade da doença em apenas 20,3%. A aplicação simultânea revelou-se como melhor método de aplicação do antagonista.

Além dos trabalhos mencionados anteriormente, o controle biológico de *R. solanacearum* já foi estudado com bactérias endofíticas (Barreti et al., 2008; Ramesh et al., 2009); rizobactérias (Guo et al., 2004) cujas propriedades atrativas do seu uso é o nicho ecológico semelhante ao do patógeno e actinomicetos (Moura & Romeiro, 1999; 2000) que apresentam fontes de antibióticos. Portanto, seria interessante estudar outros

microrganismos pouco explorados na fitopatologia, como o uso de bactérias “extremófilas”, que poderiam ser, aparentemente, mais fáceis de serem selecionados e estudados quanto à sobrevivência, a colonização, e quem sabe num futuro próximo, o desenvolvimento de formulações e modo de aplicação em campos comerciais.

### **3- Bactérias Extremófilas**

A capacidade de adaptação a alterações ambientais é uma das características mais impressionantes da vida na terra. Desde o início do século XXI, já era conhecido que o sistema solar e a terra, aparentemente inóspitos, compreendiam ambientes extremos, e surpreendentemente é que estes ambientes poderiam ser habitados por organismos (Rothschild & Mancinelli, 2001).

O termo “extremófilo” foi usado pela primeira vez por MacElroy em 1974, para designar organismos que proliferam em ambientes extremos (Santos et al., 2001). O “ambiente extremo” é um termo relativo, já que pode ser extremo para uns organismos, porém, pode ser essencial para a sobrevivência de outros. Os extremófilos se desenvolvem em condições que poderiam ser letais a maioria de outros organismos e muitos não podem sobreviver nos ambientes considerados normais.

Os ambientes extremos incluem aqueles com temperaturas elevadas (> 45~121 °C) são denominados de termófilos (> 45 °C) ou hipertermófilos (> 80 °C) (Rainey & Oren, 2006; Ramírez et al., 2006). No entanto, Pacheco & Allain (2009) consideram os termófilos com crescimento ( $\geq 40$  °C) e os hipertermófilos ( $\geq 80$  °C). Os ambientes com temperaturas baixas (-2~20 °C) estão os microrganismos conhecidos como psicrotróficos (Rainey & Oren, 2006; Ramírez et al., 2006); alta salinidade (NaCl 2-5M) estão os organismos denominados de halófilos (Ramírez et al., 2006). Segundo os autores, estes microrganismos podem ser divididos em relação à concentração de NaCl: em fracos (0,5- 10%), moderados (10-20%) e os extremos (> 20%). Entretanto, há uma controvérsia no que diz respeito aos extremos, pois Litchfield et al. (2006) preferem considerar os microrganismos halófilos extremos aqueles com crescimento em concentrações elevadas de sal, aproximadamente 10% de NaCl. Os ambientes com pH elevados (pH > 8,0) estão os microrganismos alcalófilos (Rainey & Oren, 2006; Ramírez et al., 2006); alta acidez (pH  $\leq 4,0$ ) (Ramírez et al., 2006), alta pressão atmosférica no fundo do mar (0,1 MPa a cada 10 metros), alta radiação gama (até 5 a 8

kGy) ou ultravioleta com comprimento de onda (400-500 nm). Os organismos que crescem nestes três últimos ambientes são denominados de acidófilos, barófilos e os radiófilos, respectivamente (Rainey & Oren, 2006).

Os microrganismos alcalófilos podem ser divididos em dois grupos fisiológicos: os alcalófilos e os haloalcalófilos. O primeiro estão os microrganismos que apresentam crescimento em  $\text{pH} \geq 9,0$  podendo crescer ou não, em baixa concentração de NaCl, sendo isolados principalmente de ambientes neutros, algumas vezes de solos ácidos, excrementos (Horikoshi, 2004), de sedimentos marinhos e do lençol freático com alta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (Grant, 2006). No segundo grupo, estão os microrganismos que crescem em  $\text{pH} > 9,0$  são encontrados em lagos e desertos com alta taxa de NaCl (Horikoshi, 2004; Grant, 2006; Rainey & Oren, 2006).

Esses microrganismos têm despertado grandes interesses nas indústrias, devido as suas enzimas, catalizadores biológicos capazes de acelerar as reações químicas da célula. Nas indústrias, as enzimas participam da produção de edulcorantes, papel, sínteses de detergente, na elaboração de pães e vinhos, no tratamento de resíduos, extração de petróleo, na obtenção de biochips para identificação de pessoas e diagnósticos de tratamentos (Van Den Burg, 2003), e aplicação da biotecnologia, através da enzima *taq polimerase*, amplamente utilizada na indústria para a tecnologia de PCR (Polymerase Chain Reaction).

A extremofilia não constitui uma característica filogenética, embora muitos dos exemplos tivessem ocorrido frequentemente nos domínios procariotas (Bactérias e Archaea). O Reino Bacteria (Eubacteria) abriga as bactérias verdadeiras que possuem em sua parede celular polímero insolúvel (peptidoglicana) de composição química e estrutura que variam de espécie para espécie. O Reino Archaea a parede celular é variável, não contém ácido murâmico (peptidoglicana), a membrana possui lipídios ramificados, com ligação éter. Todas as condições mais extremas que podem ocorrer tendem a pertencer ao Domínio Archaea, como os hipertermófilos com temperaturas ótimas de crescimento superior a 80 °C, os halófilos e os acidófilos mais extremos (Woese et al., 1990; Rainey & Oren, 2006).

Vários são os ambientes encontrados para os microrganismos de temperaturas elevadas. Dentre eles destacam-se as fontes termais vulcânicas terrestres (Stetter, 1999; Rothschild & Mancinelli, 2001) que são caracterizadas pela baixa salinidade (0,1 - 0,5% NaCl), pH variando de 0,5 a 9,0 e temperatura variando de 80 a 100 °C dependendo da altitude. Localizadas em Krisuvik, Hveragerthi, Kerlingafjöll (Islândia), Yellowstone

National Park (EUA), White Island (Nova Zelândia), Península Kamchatka (Rússia), Hokkaido (Japão) e Pisciarelli Solfatara, Naples (Itália) (Huber et al. 2000). As fontes termais submarinas (fumarolas hidrotermais) (Blöchl et al., 1997; Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya, 2006), localizadas na Bacia de Guaymas (Califórnia, cerca de 2000 m de profundidade), no East Pacific Rise (2500 m) e no Mid Atlantic Ridge (entre 3000 e 4000 m), com temperatura chegando a 350 °C (Huber et al. 2000).

Outros exemplos de ambientes comumente encontrados para os microorganismos termófilos estão às pilhas de carvão (Rainey & Oren, 2006), e os compostos em fermentação; podendo este último, apresentar formas diversificadas de isolamento. Beffa et al. (1996) isolaram bactérias de compostos termófilos, em sistema de compostagem ao ar livre, de resíduos de jardim, em diferentes tempos de compostagem (0, 4, 6, 10 e 115 dias), e verificaram que o maior número de bactérias formadoras de esporos foram encontradas com 4 dias (60 - 65 °C) ( $10^9$  -  $10^{10}$  ufc/g); enquanto que as bactérias não formadoras de esporos (*Thermus* sp.) apresentaram maior crescimento com 10 dias (67 - 78 °C) ( $10^8$  -  $10^9$  ufc/g). Já Watanabe et al. (2007) conseguiram isolar *Thermobacillus composti* sp. nov., de um reator de compostagem, de uso doméstico, com crescimento ótimo em 50 °C. Enquanto que, Venugopalan et al. (2008) conseguiram isolar *Bacillus* sp. diretamente de amostras de resíduos domésticos em fermentação, com crescimento em 60 °C.

Quanto ao ambiente dos microorganismos halófilos, a maioria encontra-se em regiões quentes e secas, como os lagos salinos (Oren et al., 1995; Castillo et al., 2006; Jakobsen et al., 2006), as minas de sal (Denner et al., 1994), as salinas (Ihara et al., 1997), os solos (Kobayashi et al., 1992; Ramírez et al., 2006), e os alimentos salgados (Ramírez et al., 2006). Castillo et al. (2006) isolaram uma arqueobactéria *Halovivax asiaticus* sp. nov., do Lago Ejinor, na Mongólia (China), apresentando crescimento numa faixa de 15 a 25% de NaCl.

Segundo Jones et al. (1998), os lagos sódicos são caracterizados pela presença de alta concentração de carbonato de sódio, formados pela alta taxa de evaporação da bacia, e também associados à escassez de  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , na água. Exemplos desses ambientes, é o caso do Lago Van (Turquia) onde vários isolados bacterianos apresentaram crescimento em pH 9,0 e em meios de cultura suplementados com 2 e 5% de NaCl (Berber & Yenidünya, 2005); no Lago Wadi, El-Natron (Egito) crescimento em pH 8 - 11 e 15% de NaCl (Ibrahim et al., 2007); e no Lago Lonar (Índia) verificaram que dos 31 isolados identificados, 22 apresentaram crescimento ótimo em pH 9 -10, e

somente 4 apresentaram crescimento em pH 11-12 e 14 cresceram em meio com 0,86 M (5%) de NaCl (Joshi et al., 2008).

Já os microorganismos acidófilos são facilmente encontrados em ambientes ácidos que surgem naturalmente de atividades geoquímicas, como podem ser a produção de gases sulfurosos, de origens vulcânicas (Schleper et al., 1995). Segundo os autores, nesses ambientes, localizados no norte do Japão foi possível isolar duas espécies de *Picrophilus* sp. com crescimento em pH próximo de 0. Outros lugares são as escórias das minas, como por exemplo, o “Iron Mountain Mine” na Califórnia do Norte, que isolou *Ferroplasma acidarmanus* com crescimento em meio com pH 0,5 a 1,0 (Druschel et al., 2004). Também é possível criar ambientes ácidos devido à própria atividade metabólica dos microorganismos, no Rio Tinto (González-Toril et al., 2006).

Outros microorganismos que se adaptam bem às condições extremas são os psicrotróficos que podem crescer em uma faixa de  $\leq 0^{\circ}\text{C}$  a  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ . Os principais ambientes habitados por estes microorganismos estão as regiões polares, montanhas altas, glaciares, nas profundidades dos oceanos, nos sistemas subterrâneos baixos e nas superfícies de plantas e de animais que vivem em ambientes frios, onde a temperatura nunca excede os  $5^{\circ}\text{C}$  (Ramírez et al., 2006). Os ambientes comumente encontrados para os barófilos ou piezófilos estão as profundidades marinhas, nos Oceanos; e para os radiófilos estão os ambientes marinhos expostos à radiação solar (Rainey & Oren, 2006), sendo estes três últimos grupos de microorganismos, com menos importância para o nosso estudo.

Os microrganismos extremófilos como já foram mencionados anteriormente, são de suma importância para estudos com aplicação nas indústrias e na biotecnologia, mostrando uma realidade que nos permite imaginar uma extensa área de aplicações que ainda podem ser explorados. Como exemplo, o estudo da supressão de fitopatógenos veiculados pelo solo, como controle biológico.

A aplicabilidade destes microrganismos no controle de doenças de plantas é bastante escasso. No entanto, têm-se o conhecimento que durante o processo de compostagem dos resíduos orgânicos, há uma predominância de bactérias termófilas. A compostagem pode ser definida como a decomposição dos resíduos orgânicos sob condições controladas (Hoitink & Fahy, 1986). De acordo com Hoitink & Fahy, (1986); Hoitink *et al.* (1997), o processo de compostagem por microorganismos aeróbios pode ser dividido em três fases: (1) sendo a fase inicial (com 1 a 2 dias), neste período a temperatura se eleva ( $40$  a  $50^{\circ}\text{C}$ ) e rapidamente os componentes degradáveis são

decompostos; (2) a temperatura se eleva mais ainda (55 a 70° C), podendo durar meses, as substâncias celulósicas biodegradáveis são destruídas, pelos microorganismos termófilos e (3) secagem ou estabilização, é o período em que ocorre um declínio da temperatura, a taxa de decomposição diminui, e os microorganismos mesófilos recolonizam os compostos, sendo esta fase de grande importância na supressão do patógeno e/ou doença. Segundo Nakasaki et al. (1985) as bactérias termofílicas particularmente *Bacillus* spp. dominam o início da fase de compostagem com alta atividade, enquanto que os actinomicetos termofílicos podem predominar depois.

Neste contexto, estudar bactérias extremófilas em solos agrícolas seria uma alternativa viável; visto que nos solos dos cerrados pode ocorrer baixa fertilidade, com baixo pH devido a altas concentrações de alumínio, ferro, manganês e baixos teores de fósforo, cálcio e magnésio (Oliveira et al. 2005) podendo encontrar uma população de microrganismos mais adaptados a esta condição. Outra vantagem se deve ao fato de que nestes ambientes de solos agrícolas, muitas culturas foram previamente cultivadas em solos incorporados com resíduos orgânicos, cujos efeitos benéficos podem ser observados na melhoria das características físico-químicas do solo, na melhoria das condições nutricionais e além de atuarem na supressão de doenças causadas pelos fitopatógenos. Assim, na incorporação dos resíduos orgânicos após o processo de compostagem uma população de microrganismos termófilos pode permanecer nestes solos agrícolas sob condições normais para bactérias mesófilas. Devido a esta característica foi usado no presente trabalho o termo “bactérias extremófilas facultativas”

Dessa forma seria interessante o estudo destas bactérias na supressão de *Ralstonia solanacearum* e possíveis efeitos na promoção do crescimento em plantas de tomate; visto que podem ser mais fáceis de isolar por apresentar crescimento em condições extremas de temperatura, pH e salinidade diferentes de muitas bactérias endofíticas, rizobactérias, actinomicetos e outros que apresentam estas características de comportamento semelhantes a muitos fitopatógenos. Estudos futuros também podem ser direcionados a estas bactérias para compreender melhor o efeito do tratamento dos solos através da solarização, que já tem mostrado resultados promissores no controle de muitas doenças por fitopatógenos do solo e melhoria no crescimento das plantas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucaliptos no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 31:357-366.

Alvarenga MAR (2004a) Origem, Botânica e Descrição da Planta. In: Alvarenga MAR (Ed.) **Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras MG. UFLA.pp.15-23.

Alvarenga MAR (2004b) Cultivares. In: Alvarenga MAR (Ed.) **Tomate: Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras MG.UFLA.pp.39-59.

Baptista MJ, Souza RB, Pereira W, Lopes CA, Carrijo AO (2006) Efeito da solarização e biofumigação na incidência da murcha bacteriana do tomateiro no campo. **Horticultura Brasileira** 24:161-165.

Baptista MJ, Reis Junior FB, Xavier GR, Alcântara C, Oliveira AR, Souza RB, Lopes CA (2007) Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha bacteriana do tomateiro no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42:933-938.

Barreti PB, Souza RM, Pozza EA (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores de crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciências e Agrotecnologia** 32:731-739.

Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer, JL, Aragno M (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 °C). **Applied and Environmental Microbiology** 62:1723-1727.

Berber I, Yenidünya E (2005) Identification of alkaliphilic *Bacillus* species isolated from Lake Van and its surroundings by computerized analysis of extracellular protein profiles. **Turkish Journal of Biology** 29:181-188.

Bettiol W, Ghini R, Galvão JAH, Zocchi SS (1994) Solarização do solo para o controle de *Pythium* e plantas daninhas em crisântemo. **Scientia Agricola** 51:459-462.

Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. **Extremophiles** 1:14-21.

Buddenhagen IW, Sequeira L, Kelman A (1962) Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology** 52:726.

Carvalho JL, Pagliuca LG (2007) Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. **Hortifruti** 58:6-14.

Castillo AM, Gutiérrez MC, Kamekura M, Ma Y, Cowan DA, Jones BE, Grant WD, Ventosa A (2006) *Halovivax asiaticus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56:765-770.

Charchar JM, Lopes CA (2005) Nematóides. In: Lopes CA, Ávila AC (Eds.) **Doenças do Tomateiro**. Brasília DF. Embrapa Hortaliças. pp.96-99.

Chaves AM (2006) A cultura do tomate. Disponível: [http://www.conab.gov.br/canaweb/download/cas/especiais/tomate\\_21\\_08\\_2006.pdf](http://www.conab.gov.br/canaweb/download/cas/especiais/tomate_21_08_2006.pdf). Acesso em 26 /11/2009.

Coelho Netto RA, Noda H, Boeher B (2001) *Melanthera discoidea* Brake: um novo hospedeiro de *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira** 26 (Supl.):781.

Coelho Netto RA, Pereira BG, Noda H, Boher B (2004) Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 29:21-27.

Costa SB, Ferreira MASV, Lopes CA (2007) Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira** 32:285-294.

Della Vecchia PT, Koch PS (2000) Tomates longa vida: O que são, como foram desenvolvidos? **Horticultura Brasileira** 18: 3-4.

Denner EBM, McGenity TJ, Busse HJ, Grant WD, Wanner G, Stan-Lotter H (1994) *Halococcus salifodinae* sp. nov., an archaeal isolate from an Austrian salt mine. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:774-780.

Druschel GK, Baker BJ, Gihring TM, Banfield JF (2004) Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. **Geochemical Transactions** 5:13-32.

Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex?” In: Allen C, Prior P, Hayward AC (Eds.) **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul, MN: APS press. pp.449-461.

Garrity GM, Bell JA, Lilburn T (2005) Classe II Betaproteobacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (Eds.) **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**. Michigan State University. 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 2. pp. 575-623.

Ghini R, Bettiol W (1995) Controle fisico. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim A (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo. Ceres. pp.786-803.

González-Toril E, Gómez F, Malki M, Amils R (2006) The Isolation and Study of Acidophilic Microorganisms. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** Vol.35. **Methods in Microbiology**. 1° Ed. Academic Press. pp.471-510.

Grant WD (2006) Cultivation of aerobic alkaliphiles. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** Vol.35. **Methods in Microbiology**. 1° Ed. Academic Press. pp.439-449.

Granada GA, Sequeira L (1983) Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. **Canadian Journal of Microbiology** 29:433-440.

Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control** 29:66-72.

Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. **Journal of Applied Bacteriology** 27:265-277.

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Reviews Phytopathology** 29:65-87.

Hayward AC (1994) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward AC, Hartman GL (Eds.) Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford. CAB. pp.123-135.

Hoitink HAJ, Fahy PC (1986) Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology** 24:93-114.

Hoitink HAJ, Stone AG, Han DY (1997) Suppression of plant diseases by composts. **HortScience** 32:184-187.

Horikoshi BK (2004) Alkaliphiles. **Proceedings of the Japan Academy Series B** 80:166-176.

Horita M, Tsuchiya K (2001) Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology** 91:399-407.

Horita M, Tsuchiya K, Ooshiro A (2005) Characteristics of *Ralstonia solanacearum* biovar N2 strains in Asia. **Journal of Phytopathology** 253:209-213.

Huber R, Huber H, Stetter KO (2000) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. **FEMS Microbiology** 24:615-623.

IBGE Produção Agrícola Municipal- Lavouras Temporárias- 2004 -2008. Disponível: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=2&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>. Acesso em 25 /11/2009.

Ibrahim ASS, Ei-Shayeb NMA, Mabrouk SS (2007) Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian Soda Lake. **Journal of Applied Sciences Research** 11:1363-1368.

Ihara K, Watanabe S, Tamura T (1997) *Haloarcula argentinensis* sp. nov., and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. **International Journal of Systematic Bacteriology** 47:73-77.

Jakobsen TF, Kjeldsen KU, Ingvorsen K (2006) *Desulfohalobium utahense* sp. nov., a moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Great Salt Lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56:2063-2069.

Jaunet TX, Wang JF (1999) Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. **Phytopathology** 89:320-327.

Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, Owenson GG (1998) Microbial diversity of soda lakes. **Extremophiles** 2:191-200.

Joshi AA, Kanekar PP, Kelkar AS, Shouche YS, Vani AA, Borgave SB, Sarnaik SS (2008) Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India. **Microbial Ecology** 55:163-172.

Katan J (1981) Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. **Annual Review Phytopathology** 19:211-236.

Katan J, DeVay JE (1991) Soil solarization. **Boca Raton, CRC Press**, 267p.

Katan J, Greenberger A, Alon H, Gristein A (1976) Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil-borne pathogens. **Phytopathology** 66:683-688, 1976.

Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium médium. **Phytopathology** 44:693-695.

Kobayashi T, Kanai H, Hayashi T, Akiba T, Akaboshi R, Horikoshi K (1992) Haloalkaliphilic maltotriose-forming  $\alpha$ -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-6. **Journal of Bacteriology** 174:3439-3444.

Kurozawa C, Pavan MA (2005) Doenças do Tomateiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) **Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4ª ed. São Paulo. Ceres. pp.607-626.

Lião CH (1989) Antagonismo of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopatogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. **Plant Disease** 73:223-226.

Litchfield CD, Sikaroodi M, Gillevet PM (2006) Characterization of Natural Communities of Halophilic Microorganisms. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** Vol.35. **Methods in Microbiology**. 1º Ed. Academic Press. pp.513-533.

Lopes CA, Nazareno NRX, Furiati RS (1993) Prevalência mas não exclusividade da raça 3 de *Pseudomonas solanacearum* em batata no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 18 (Supl.):284.

Lopes CA, Santos JRM (1994) **Doenças do Tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPq: EMBRAPA-SPI. 61p.

Lopes CA, Quezado-Soares AM (2000) Doenças causadas por bactérias em tomate. In: Zambolim L, Vale FXR, Costa H (Eds.) **Controle de Doenças de Plantas- Hortaliças**. Volume 2. Viçosa MG. UFV. pp.757-799.

Lopes CA, Santos JRM, Ávila AC, Bezerra IC, Charchar JM, Quezado-Duval AM (2000) Doenças: Identificação e Controle. In: Silva JBC, Giordano LB. **Tomate para processamento industrial**. Brasília DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Embrapa Hortaliças. pp.88-111.

Lopes CA, Quezado-Duval AM (2005a) Doenças bacterianas. In: Lopes CA, Ávila AC (Eds.) **Doenças do Tomateiro**. Brasília DF. Embrapa Hortaliças. pp.54-73.

Lopes CA, Reis A, Boiteux LS (2005b) Doenças fúngicas. In: Lopes CA, Ávila AC (Eds.) **Doenças do Tomateiro**. Brasília DF. Embrapa Hortaliças. pp.18-51.

Makishima N, Melo WF (2004) O rei das hortaliças: o tomateiro é a mais importante das hortaliças e, no Brasil, a produtividade média é duas vezes maior que em outros países. **Cultivar Hortaliças e Frutas** 5:28-32.

Malavolta Júnior VA, Rodrigues Neto J (1991) Controle de doenças causadas por bactérias em tomateiro. In: **II Encontro Nacional de Produção e Abastecimento de Tomate**. Jaboticabal SP. Ed. UNESP. pp. 166-182.

Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA (2006) Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. **Extremophiles** 10:85-96.

Moura AB, Romeiro RS (1999) Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). **Ciência e Agrotecnologia** 23:281-288.

Moura AB, Romeiro RS (2000) Actinomicetos pré-selecionados para controle de *Ralstonia solanacearum* como promotores de crescimento do tomateiro. **Revista Ceres** 47:613-626.

Nagata AKI, Ávila AC, Lopes CA (2005) Doenças viróticas. In: Lopes CA, Ávila AC (Eds.) **Doenças do Tomateiro**. Brasília DF. Embrapa Hortaliças. pp.76-93.

Nakasaki K, Sasaki M, Shoda M, Kubota H (1985) Change in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO<sub>2</sub> evolution rate. **Applied Environmental Microbiology** 49:37-41.

Oliveira IP, Costa KAP, Santos KJG, Moreira FP (2005) Considerações sobre a acidez dos solos do cerrado. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos** 1:01-12.

Oren A, Gurevich P, Gemmell RT, Teske A (1995) *Halobaculum gomorense* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45:747-754.

Pacheco SMV, Allain O (2009) Extremófilos e suas estratégias de adaptação a ambientes extremos. **Caderno de Ensino de Ciências e Tecnologia** 1:10-20.

Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 23:333-339.

Palleroni NJ (1984) Pseudomonadaceae Winslow, Broadhurst, Buchabab, Krumwiede, Rogers and Smith 1917. In: Krieg NR, Holt JG. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, V.1.pp.141-219.

Peixoto A (2003) O mercado de tomate no Brasil e suas tendências. Disponível: [http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/wrktom\\_001.pdf](http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/wrktom_001.pdf). Acesso em 26/ 11/ 2009.

Peixoto AR (1997) Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural** 27:153-160.

Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J (1999) Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. **Applied and Environmental Microbiology** 65:2184-2194.

Prior P, Fegan M (2005) Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. **Acta Horticulturae** 695:127-136.

Quezado-Soares AM, Lopes CA (1994) Murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em duas espécies de plantas daninhas da família Labiatae. **Fitopatologia Brasileira** 19:581-584.

Rainey FA, Oren A (2006) Extremophiles microorganism and the methods to handle them. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** vol.35. **Methods in Microbiology**. 1º Ed. Academic Press. pp.1-25.

Ramesh R, Joshi AA, Ghanekar MP (2009) Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25:47-55.

Ramírez ND, Serrano JAR, Sandoval HT (2006) Microorganismos Extremófilos. Actinomicetos Halófilos en México. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas** 37:56-71.

Ribeiro ZMA (1993) Controle biológico da murcha bacteriana das solanáceas causada por *Pseudomonas solanacearum*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Brasília, UnB. Brasília DF.

Romeiro RS (2001) **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa MG: UFV. 279p.

Romeiro RS (2005) **Bactérias Fitopatogênicas**. 2.ed. atualizada e ampliada. Viçosa MG: UFV. 417p.

Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. **Nature** 409:1092-1101.

Santos H, Lamosa P, Costa MS (2001) Extremófilos: microorganismos à prova de agressões ambientais extremas. **Boletim de Biotecnologia** 69:1-10.

Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP, Zillig W (1995) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, Thermoacidophilic Genus and Family comprising Archaea capable of growth around pH 0. **Journal of Bacteriology** 177:7050-7059.

Silveira JRP, Duarte V, Moraes MG, Oliveira AMR, Barni V, Maciel JLN (2005) Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 30:615-622.

Singh R (1994) Seed transmission studies with *Pseudomonas solanacearum* in tomato and eggplant. **Bacterial Wilt Newsletter** 11:12-13.

Smith JJ, Offord LC, Holderness M, Saddler GS (1995) Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. **Applied and Environmental Microbiology** 61:4263-4268.



- Souza NL (1994) Solarização do solo. **Summa Phytopathology** 20:3-15.
- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. **FEBS Letters** 452:22-25.
- Takatsu A, Lopes CA (1997) Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira** 15:170-177.
- Trebesch EA (2008) Panorama do Tomate no Brasil. Disponível: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/images/eventos/arquivos/PainelABT Tomate.pdf>. Aceso em 25/11/2009.
- Vale FXR, Zambolim L, Zambolim EM, Alvarenga MAR (2004) Manejo Integrado das Doenças do Tomateiro: Epidemiologia e Controle. In: Alvarenga MAR (Ed.) **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras MG.UFLA.pp.213-308.
- Van den Burg B (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. **Current Opinion in Microbiology** 6:213-218.
- Vanitha SC, Niranjana SR, Mortensen CN, Umesha S (2009) Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. **BioControl** 54:685-695.
- Venugopalan V, Singh B, Verma N, Nahar P, Bora TC, Das RH, Gautam HK (2008) Screening of thermophiles from municipal solid waste and their selective antimicrobial profile. **Current Research in Bacteriology** 1:17-22.
- Xue QY, Chen Y, Li SM, Chen LF, Ding GC, Guo DW, Guo JH (2009) Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. **Biological Control** 48:252-258.
- Zhang YX, Hua JY, HE LY (1993) Effect of infected groundnut seeds on transmission of *Pseudomonas solanacearum*. **Bacterial Newsletter** 9:9-10.
- Watanabe K, Nagao N, Yamamoto S, Toda T, Kurosawa N (2007) *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57:1473-1477.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA** 87:4576-4579.

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology grupo II to the New Genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology** 36:1251-1275.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal de *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and doudoroff 1973) com. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) com. nov. **Microbiology and Immunology** 39:897-904.

Yu Q, Alvarez AM, Moore PH, Zee F, Kim MS, Silva A, Hepperly PR, Ming R (2003) Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. **Phytopathology** 93:1125-1130.

## OBJETIVOS

---

- (1) Isolar e identificar bactérias extremófilas facultativas, em diferentes tipos de solos cultivados e não cultivados;
- (2) Determinar diferentes grupos de bactérias que se adaptam em condições extremas de temperatura, pH e salinidade;
- (3) Estudar o efeito das bactérias extremófilas facultativas na promoção do crescimento das plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), em casa de vegetação, com aplicação individual dos isolados e em combinações;
- (4) Estudar o efeito das bactérias extremófilas facultativas na supressão da murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, em testes *in vitro* e *in vivo*, sendo este último com aplicação individual dos isolados e em combinações.

### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS EM DIFERENTES TIPOS DE SOLOS

#### RESUMO

Até o momento pouco estudo tem sido realizado no Brasil a respeito de bactérias extremófilas facultativas, em solos agrícolas. Com o objetivo de estudar diferentes grupos de bactérias que se adaptam as condições extremas de temperatura, pH e salinidade e a identificação destes isolados, foram coletadas diferentes amostras de solos, no município de Brazlândia, em Brasília, DF, Brasil. Obteve-se um total de trinta e oito isolados os quais foram submetidos aos testes de temperaturas (45, 55, 65 e 75 °C), pH (3, 4, 5, 9, 10 e 11) e salinidade (5, 10 e 15 % de NaCl). Onze isolados foram selecionados para caracterização bioquímica e identificação baseada nas sequências 16S DNAr. Verificou-se que em todas as amostras de solos determinaram-se quatro grupos de bactérias, sendo que em cada um observou a presença de isolados crescendo nas condições mais extremas. Dos onze isolados selecionados, todas as bactérias foram Gram negativa, podendo separá-los em três grupos distintos, com base nas reações positivas para as características bioquímicas: o primeiro grupo formado, com base no teste de oxidação/fermentação da glicose, obteve-se sete isolados pertencendo à família Enterobacteriaceae; o segundo grupo com base no crescimento em meio King-B, obteve-se dois isolados de *Pseudomonas* sp.; e o terceiro grupo não relacionados taxonomicamente, com dois isolados, *Giesbergeria* sp. e *Chryseobacterium* sp. O presente trabalho, pioneiro em solos agrícolas, contribui para que estudos posteriores possam ser direcionados para o comportamento destas em diferentes patossistemas.

**Palavras-chave:** isolamento, microbiologia do solo, bactérias temófilas, bactérias alcalófilas, bactérias acidófilas, bactérias halófilas, 16S DNAr.

## CHAPTER 1

---

### ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FACULTATIVE EXTREMOPHILE BACTERIA IN SEVERAL TYPES OF SOIL

#### ABSTRACT

Until now there have been few studies in Brazil involving facultative extremophile bacteria in agricultural soils. This work aimed to study several groups of bacteria that adapt themselves to extreme conditions of temperature, pH and salinity and to identify these isolates. To this end, several soil samples were collected in the municipality of Brazlândia, near Brasília, Federal District, Brazil. A total of 38 isolates were submitted to temperature tests (45, 55, 65 and 75 °C), pH tests (3, 4, 5, 9, 10 and 11) and salinity tests (5, 10 and 15 % of NaCl). Eleven isolates were selected for biochemical characterization and identification based on the 16S DNAr sequences. It was confirmed that in all the soil samples four groups of bacteria were categorized, and in each one the presence of isolates growing in highly extreme conditions was observed. Of the 11 selected isolates, all the bacteria were Gram-negative, and these could be separated into three distinct groups, based on their positive reactions to biochemical characteristics. From the first group, based on the glucose oxidation/fermentation test, we obtained seven isolates belonging to the family Enterobacteriaceae; from the second group, based on growth in King-B medium, we obtained two isolates of *Pseudomonas* sp.; the third, taxonomically unrelated group, showed two isolates, *Giesbergeria* sp. and *Chryseobacterium* sp. The current work, unprecedented in agricultural soils, will pave the way for future studies to examine the behavior of these bacteria in different pathosystems.

**Key words:** isolation, soil microbiology, thermophilic bacteria, alkalophilic bacteria, acidophilic bacteria, halophilic bacteria, 16S DNAr.

## 1-INTRODUÇÃO

Sabe-se que o solo é composto de três fases sendo em sua maior quantidade de fase sólida (50%), incluindo os materiais minerais e matéria orgânica; fase líquida (25%) ocupado por água e a fase gasosa (25%) preenchidos por gases O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N e vapor de água. A matéria orgânica do solo, embora em menor proporção (4%) (Neves, 2006) é um dos componentes de extrema importância para a ecologia microbiana do solo (Hoper & Alabouvette, 1996; Hoitink & Boehm, 1999).

Os microrganismos do solo podem desempenhar diferentes atividades, como: decomposição de matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia (incluindo a fixação de nitrogênio atmosférico), produção de compostos complexos contribuindo para agregação do solo, decomposição de xenobióticos e controle biológico de pragas e doenças, proporcionando assim, condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (Siqueira, 1993; Moreira & Siqueira, 2006).

A decomposição dos resíduos culturais depende da natureza e da quantidade do material vegetal, da fertilidade do solo, do grau de fracionamento do resíduo, além das condições climáticas, representadas principalmente pelo regime de chuvas e pela temperatura, que influenciam a atividade microbiana do solo (Bertol et al., 2004).

De acordo com Souto et al. (2008) uma flora variada de bactérias e fungos pode realizar a degradação completa de material orgânico, mas em prática eles raramente agem sozinhos. Isto é confirmado por Persson (1980) citado por Moreira & Siqueira (2006) em seu trabalho mostrando que fungos e bactérias são responsáveis por 96% da respiração total do solo, enquanto a fauna contribui com apenas 4%. Beare et al. (1990) verificaram que a quantidade total de C respirado foi de 7,5 Mg/ ha (750 g/ m<sup>2</sup>) em 182 dias sendo as bactérias responsáveis por 63% de carbono respirado, enquanto os fungos e protozoários apenas 25%, atingindo 88% da respiração total.

As bactérias do solo constituem o grupo mais numeroso e de maior importância, pois além de promoverem doenças em plantas e animais, são responsáveis por inúmeras transformações relacionadas com a fertilidade do solo. Normalmente a população bacteriana no solo é estimada entre 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônias por grama de solo (ufc/g), variando bastante com o solo, com o manejo e com o método usado na avaliação (Brandão, 1992). Os actinomicetos entre estes, *Streptomyces* é o mais amplamente distribuído, e o seu nicho primário é o solo, com uma população variando de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> ufc/g de solo, com maior ocorrência de esporos do que de hifas

vegetativas (Lechevalier, 1981). Os actinomicetos também representam uma grande parte da microbiota da rizosfera e suas interações têm sido largamente estudadas para a fixação biológica do nitrogênio (Liu & Tang, 1996). Os fungos são encontrados no solo com variação entre  $10^4$  a  $10^6$  ufc/g de solo (Alexander, 1977) e ocorrem em maior quantidade nas camadas superficiais dos solos, em função do alto teor de matéria orgânica e maior aeração (Malavolta, 1980).

Existem vários fatores físicos e químicos que podem influenciar os microrganismos, como por exemplo: as práticas de manejo que promovem alteração na abundância de organismos e diversidade de espécies, ocorrendo alterações das próprias características do solo (Socarrás, 1998 citado por Cruz et al., 2007). Segundo Vargas et al. (2004), o preparo freqüente do solo, pode ocasionar rompimento físico das hifas, prejudicando a população fúngica. Outros fatores como substrato orgânico, nutrientes e minerais, pH do solo, umidade e temperatura, mencionados anteriormente, também podem influenciar no tipo de microrganismos presentes no solo. Allison & Killham (1988) constataram aumento da população fúngica após a incorporação de palha de cevada e uma menor imobilização do N. Palhas de cereais são decompostas principalmente por fungos, cuja relação C:N é mais elevada do que bactérias e actinomicetos (Wheatley et al., 1990; Garcia & Rice, 1994). Dessa forma, a população bacteriana pode ser favorecida simplesmente pelo aumento da disponibilidade de nitrogênio, que conseqüentemente reduzirão a relação C:N da biomassa microbiana (Vargas et al., 2004). Segundo Moreira & Siqueira (2006) os fungos são mais adaptados em solos cujo pH é menor que 5,0; enquanto que as bactérias, incluindo os actinomicetos estão em solos com pH entre 6 e 8, por serem ambos competidores eficientes.

O método clássico de estudo da comunidade bacteriana é baseado na caracterização fenotípica e genotípica de organismos isolados e cultivados em laboratório. No entanto, tem sido demonstrado que organismos cultivados representam apenas uma pequena fração da diversidade de espécies em comunidades microbianas. Para transpor as dificuldades e limitações associadas com as técnicas de cultivo tradicionais, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para acessar diretamente o genoma desses organismos e também esforços para cultivá-los sobre condições de laboratório. Metagenômica é um novo campo de investigação que utiliza ferramentas da Biologia Molecular para investigar a ecologia procariótica global assim como para acessar o vasto potencial biotecnológico oculto com o mundo procariótico.

Basicamente, metagenômica compreende isolamento do DNA ambiental total e a produção e triagem de bibliotecas metagenômicas (Rondon et al., 2000) através do sequenciamento do gene 16S rDNA.

Os segmentos 16S rDNA podem ser considerados excelentes marcadores moleculares, uma vez que abrigam características conservadas em todos os genomas de bactérias durante a evolução (Atlas & Bartha, 1998). As primeiras pesquisas com essa metodologia no Brasil foram relatadas por Borneman & Triplett (1997) que analisaram a diversidade de bactérias do solo da Amazônia em vários ambientes. Silveira et al. (2006) estimaram a diversidade bacteriana, através da técnica metagenômica, em solos brasileiros de duas áreas: uma com floresta nativa e outra adjacente com arboreto de eucaliptos. As análises filogenéticas revelaram diferenças entre os tipos de solos e alta diversidade em ambas as comunidades. No solo de arboreto de *Eucalyptus* spp. foi encontrado maior diversidade bacteriana em comparação com solo da área de floresta nativa.

Como vimos a decomposição da matéria orgânica resulta em vários benefícios para o solo, gerando uma microbiota bem diversificada em diferentes condições físico-químicas. No entanto, pouco se conhece sobre a presença de bactérias “extremófilas” em solos cultivados e não cultivados. Bactérias extremófilas são aquelas bactérias que desenvolvem em condições extremas de temperatura sendo denominadas de termófilas ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ) (Rainey & Oren, 2006; Ramírez et al., 2006), hipertermófilas ( $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ) (Godfroy et al., 2006) e psicrófilas ( $-2 \sim 20^{\circ}\text{C}$ ) (Ramírez et al., 2006), pH temos as acidófilas ( $\text{pH} \leq 4,0$ ) (Ramírez et al., 2006) e as alcalófilas ( $\text{pH} > 8,0$ ) (Rainey & Oren, 2006; Ramírez et al., 2006) e quanto à salinidade temos as bactérias denominadas de halófilas ( $\text{NaCl} \sim 10\%$ ) (Litchfield et al., 2006).

Em solos não cultivados, somente com a vegetação nativa da região do Cariri, no Estado da Paraíba, Gorchach-Lira & Coutinho (2007) isolaram bactérias mesófilas e termófilas do solo da caatinga e da rizosfera de *Aristida adscensionis* L. e verificaram que não houve diferenças significativas na densidade populacional de ambas as amostras; entretanto, o número de bactérias mesófilas (43 isolados) foram superiores ao número de bactérias termófilas (34). Segundo Gorchach-Lira & Coutinho (2007), deste número nem todas foram chamadas de termófilas, somente 85,3% às que apresentaram  $T_{\text{min}} > 30^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{max}} > 55^{\circ}\text{C}$ , as demais consideradas termotolerantes, com base na classificação de Sonnleitner's (1983). A maioria das bactérias termófilas ou hipertermófilas tem sido isolada de fontes termais vulcânicas terrestres (Stetter, 1999;



Rothschild & Mancinelli, 2001), fontes termais submarinas (Blöchl et al., 1997; Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya, 2006), e em compostos em fermentação (Beffa et al., 1996; Watanabe et al., 2007; Niisawa et al., 2008; Venugopalan et al., 2008).

As bactérias halófilas e alcalófilas podem ser encontradas em um mesmo ambiente, visto que as condições propícias para ambos os tipos de bactérias são em geral regiões quentes e secas, com ampla faixa de concentração de NaCl; ou podem ocorrer casos em que a mesma espécie sobrevive em condições extremas de salinidade e pH elevado. Ibrahim et al. (2007) coletaram amostras de solo e de água, no lago sódio do Wadi El-Natron, no norte do Egito e verificaram a presença de bactéria halófila e alcalófila, identificada como *Bacillus halodurans*, com crescimento em meio suplementado com 15% de NaCl e pH na faixa de 8-11, respectivamente. Outros ambientes onde se encontram as bactérias halófilas são as minas de sal (Denner et al., 1994), as salinas (Ihara et al., 1997), os solos (Kobayashi et al., 1992; Ramírez et al., 2006), e os alimentos salgados (Ramírez et al., 2006). Os ambientes para as bactérias alcalófilas são os lagos sódios com alta concentração de carbonato de sódio (Jones et al., 1998).

As bactérias acidófilas são facilmente encontradas em ambientes ácidos que ocorrem produção de gases sulfurosos, de origens vulcânicas (Schleper et al., 1995) e escórias de minas (Druschel et al., 2004), sendo também encontradas em solos do cerrado. Solos ácidos representam sério problema para o desenvolvimento das plantas e estabelecimento de uma simbiose eficiente. De acordo com Andrew (1962), a influência da acidez do solo pode ser desdobrada nos efeitos da concentração de íons H, nas deficiências de cálcio e molibdênio e na toxidez de alumínio e manganês. Os efeitos da acidez na fixação simbiótica são extremamente complexos e manifestam-se essencialmente através da influência sobre a própria bactéria ou sobre a planta. A tolerância à acidez e ao alumínio nocivo vem sendo bem estudada, com trabalhos mostrando a eficiência de estirpes selecionadas para condições de acidez e alto teor de alumínio (Franco et al., 1994; Stamford et al., 1997).

Como vimos há poucos relatos de bactérias extremófilas em solos agrícolas, sendo interessante estudar o seu comportamento em diferentes tipos de solos, bem como a influência destas no manejo de diversas culturas. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias extremófilas facultativas, termo usado para representar bactérias capazes de crescer tanto em condições mais extremas, quanto em condições mais

próximas da neutralidade, em diferentes tipos de solos e determinar os principais grupos de bactérias que se adaptam em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Localização da área e a coleta do material**

As amostras de solos foram coletadas em fevereiro de 2007, no Centro de Produção de Agricultura Natural MOA, localizada no município de Brazlândia a 45 km de Brasília-DF. A maior parte do material coletado procedera de solos cultivados com: cenoura (*Daucus carota*), pimentão (*Capsicum annuum*), milho (*Zea mays*), crotalária (*Crotalaria juncea*) e maracujá (*Passiflora edulis*) sendo que neste último foram amostradas duas áreas, uma tratada com matéria orgânica (MO) e outra sem matéria orgânica. Uma menor parte do material coletado correspondeu a solos não cultivados como: cerrado, composto orgânico e composto bioativo (Bokashi). As características químicas dos solos estão representadas na (Tabela 1.1). Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília, durante o período de fevereiro a novembro de 2007. As amostras de solos foram dos 20 cm iniciais, acondicionadas em sacos plásticos, e mantidas em câmara fria a 4 °C até a etapa do isolamento.

**Tabela 1.1-** Caracterização química dos solos cultivados (SC) e solos não cultivados (SNC).

Solos	MO*	pH em	Al	Ca+Mg	P	K
		CaCl <sub>2</sub>				
Cultivados (SC)	(g/dm <sup>3</sup> )	(1;2,5)	(c mol/dm <sup>3</sup> )		(mg/dm <sup>3</sup> )	
Com cultivo <sup>1</sup>	51,00	5,40	0,00	6,10	31,70	115,00
Crotalaria	33,00	4,60	0,10	2,70	1,20	35,00
Maracujá s/ MO	31,00	4,60	0,10	2,20	4,30	21,00
Maracujá c/ MO	40,00	4,40	0,10	1,90	1,20	37,00
<b>Solos Não Cultivados (SNC)</b>						
Comp. Orgânico	234,00	7,14	–	–	18,76	5,80
	(g/kg)				(g/kg)	(g/kg)
Bokashi	220,00	7,60	–	–	18,00	4,20
	(g/kg)				(g/kg)	(g/kg)
Cerrado	23,00	3,46	2,40	0,70	0,72	22,00

\*MO- Matéria Orgânica  
1-cenoura, pimentão e milho  
- resultados não amostrados

## 2.2 - Isolamento, purificação e manutenção de bactérias extremófilas facultativas

Foram preparados nove frascos com 100 mL de meio líquido 523 (Kado & Heskett, 1970), um para cada amostra de solo. Em cada um deles foram acrescentados 5 g do solo correspondente, posteriormente agitados e colocados na incubadora a 28 °C, por 48 h. Após estes procedimentos foram retirados 50 µl do meio líquido e distribuídos em placas de 90 mm Ø, com meio sólido 523, mantidos na mesma temperatura e tempos anteriores. Foram realizadas várias repicagens até a obtenção de isolados puros, os quais se mantiveram preservados em tubos com tampas de roscas, com 10 mL de água destilada estéril à temperatura ambiente. Para preservação em longo prazo, os

isolados foram mantidos em glicerol 50% a -20 °C. Em cada amostra de solo foram determinados diferentes isolados bacterianos.

### **2.3- Determinação dos grupos de bactérias em condições extremas de temperatura, pH e salinidade**

Na determinação de diferentes grupos de bactérias realizaram-se os seguintes testes: para bactérias termófilas foram testadas as temperaturas de 45, 55, 65 e 75 °C; acidófilas em pH 3, 4 e 5; alcalófilas em pH 9, 10 e 11 e halófilas nas concentrações de NaCl de 5, 10 e 15%. Cada isolado cultivado, previamente em placas de Petri, em meio 523 (sólido) com 24 h foi retirada com alça de platina, uma pequena quantidade de colônia bacteriana, adicionado em tubos com 10 mL de meio 523 (líquido) os quais estavam inicialmente armazenados em geladeira a 5°C.

Após a inoculação de cada tubo, estes foram agitados até a completa dissolução da colônia e imediatamente conduzidos ao espectrofotômetro ( $\lambda = 550$  nm) para leitura inicial do crescimento bacteriano. Em seguida estes tubos foram levados a estufa com a temperatura ajustada para cada teste (para o grupo das termófilas). O ajuste da temperatura da estufa foi realizado semanalmente, correspondendo a cada temperatura testada. Nos demais grupos de bactérias estudados, após as leituras iniciais, todos isolados foram mantidos a 28 °C por 72 h. Após este período de armazenamento na estufa foram realizadas leituras finais para verificação do crescimento bacteriano. Em cada teste realizado, para confirmação dos dados foram submetidos a duas repetições.

### **2.4 - Seleção dos isolados para estudos posteriores**

Foram selecionados 11 isolados que apresentaram maiores crescimento bacteriano ( $\lambda = 550$  nm), com base nas características em comum: temperatura de 45 °C, pH 4 e 10, salinidade NaCl 5 e 10%. Os isolados selecionados foram utilizados para estudos posteriores, em casa de vegetação, visando a promoção do crescimento das plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e controle da murcha bacteriana do tomateiro (*Ralstonia solanacearum*).

## **2.5 - Identificação dos isolados**

### **2.5.1- Caracterização bioquímica e morfológica**

A partir do isolamento e preservação em tubos com água, todos os isolados foram submetidos aos seguintes testes bioquímicos, que são normalmente utilizados para bactérias fitopatogênicas: oxidação/fermentação da glicose; catalase; oxidase; teste para produção de pigmento fluorescente (meio King - B); teste com a utilização de asparagina como fonte de carbono e energia e teste para verificação da produção de endosporos; todos os testes foram realizados segundo as metodologias de Mariano et al. (2005). Além desses testes bioquímicos, também foram observadas as características morfológicas, quanto à pigmentação, o tamanho, a consistência, as bordas e a forma; juntamente com a coloração de Gram, todas as características visualizadas no microscópio ótico.

### **2.5.2- Sequenciamento e filogenia dos isolados baseada em sequências do gene 16S**

#### **DNAr**

Onze isolados selecionados conforme o item 2.4, foram enviados a empresa In Vitro Palm Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico LTDA, situada em Piracicaba- SP, para identificação dos isolados ao nível de gênero. A identificação foi realizada com base nas sequências do gene 16S ribossomal (16S DNAr). Esse gene é o mais amplamente utilizado, sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (Lows et al., 1999). O sequenciamento desse gene permite a identificação de microrganismos no nível de gênero e possivelmente no nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (Cheneby et al., 2000).

A partir da cultura sólida de 11 isolados foi realizada a extração de DNA utilizando o *Wizard DNA extraction kit* (Promega, Madison, USA), seguindo as indicações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene 16S ribossomal (16S DNAr) em reação de amplificação com os *primers* R1387 (5' - CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG - 3') e P027F (5' - GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3'). As reações foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 3,75 mM

de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 1 min a 62,5 °C; 1 min a 72 °C, e uma extensão final de 7 min a 72 °C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,0% a 3  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ , juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultravioleta.

O produto de PCR gerado pela amplificação com os *primers* P027 e R1387 foi purificado com o *PCR purification PowerClean™ DNA Clean-Up Kit* (MoBio Laboratories, EUA) e submetidos a seqüenciamento. Esta etapa foi realizada por meio do seqüenciamento utilizando três iniciadores distintos [R1387, XXX e 530R (5' - CCG CGG CKG CTG GCA C – 3')], dando origem a fragmentos de diferentes regiões do gene alvo. As seqüências obtidas foram avaliadas quanto a sua qualidade no site *Ribosomal Data Project (RDP - <http://rdp.cme.msu.edu/>)*, onde o *pipeline* disponível fez a avaliação da qualidade de cada base seqüenciada dando origem aos fragmentos seqüenciados confiáveis em cada amostra. Estes fragmentos foram unidos com base na sobreposição de extremidades, realizada no programa *DNABaser*, o que deu origem ao *contig* usado na análise filogenética dos isolados obtidos neste estudo.

As seqüências obtidas para cada isolado foram submetidas à comparação por similaridade por BlastN contra a base de dados do GenBank (Altschul et al., 1990) e por meio de classificação taxonômica no banco de dados do *RDP*. As seqüências presentes nestes bancos de dados que mostraram similaridade com as seqüências obtidas dos isolados foram utilizadas para a análise da filogenia dos grupos bacterianos isolados. Os alinhamentos e a filogenia foram realizados no programa MEGA versão 3.1, onde após o alinhamento, as seqüências tiveram suas similaridades determinada pelo método de Kimura-2, e a árvore filogenética foi calculada pela metodologia de *neighbour-joining* (Kumar et al., 2004). A confiabilidade de cada agrupamento observado na árvore foi dada pelo teste *bootstrap*, baseado em 100 permutações aleatórias.

### **3 - RESULTADOS**

#### **3.1 - Isolamentos de bactérias extremófilas facultativas**

De todas as amostras de solos foram obtidos um total de 38 isolados bacterianos diferentes, sendo que em algumas amostras de solos foi possível obter mais isolados do que em outras amostras. Assim, nas amostras de solos com cenoura (*Daucus carota*) obtiveram-se 9 isolados com características morfológicas (coloração, formato, pigmentação) diferentes; pimentão (*Capsicum annuum*) 2 isolados; milho (*Zea mays*) 6 isolados; crotalaria (*Crotalaria juncea*) 4 isolados; maracujá (*Passiflora edulis*) área tratada com MO, 3 isolados e área sem MO com 5 isolados; amostra de solo do cerrado com um único isolado; composto orgânico com 3 isolados e finalmente composto bioativo (Bokashi) com 5 isolados (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2-** Isolados bacterianos utilizados no estudo.

<b>Isolados</b>	<b>Sigla</b>	<b>Tipos de Solos</b>
UnB 1321	BK 8	Bokashi
UnB 1322	CE 10	SC**
UnB 1323	BK 5	Bokashi
UnB 1324	CD 2	Cerrado- SNC
UnB 1325	MI 2	SC
UnB 1326	PI 2	SC
UnB 1327	CR 2	SC
UnB 1328	BK 6	Bokashi
UnB 1329	CE 3	SC
UnB 1330	BK 1	Bokashi
UnB 1331	CO 2	Composto Orgânico
UnB 1332	CE 1	SC
UnB 1333	CE 2	SC
UnB 1334	CE 5	SC
UnB 1335	CE 6	SC
UnB 1336	CE 8.2	SC
UnB 1337	CE 9.1	SC
UnB 1338	CE 9.2	SC
UnB 1339	BK 4	Bokashi
UnB 1340	CO 3	Composto Orgânico
UnB 1341	CO 4	Composto Orgânico
UnB 1342	Ma s/ MO 1.1	SC
UnB 1343	Ma s/ MO 1.2	SC
UnB 1344	Ma s/ MO 3	SC
UnB 1345	Ma s/ MO 4	SC
UnB 1346	Ma s/ MO 5	SC
UnB 1347	MI 1	SC
UnB 1348	MI 3	SC
UnB 1349	MI 4	SC
UnB 1350	MI 5	SC
UnB 1351	MI 6	SC
UnB 1352	Ma c/ MO 2	SC
UnB 1353	Ma c/ MO 3	SC
UnB 1354	Ma c/ MO 4	SC
UnB 1355	PI 1	SC
UnB 1356	CR 1	SC
UnB 1357	CR 3	SC
UnB 1358	CR 4	SC

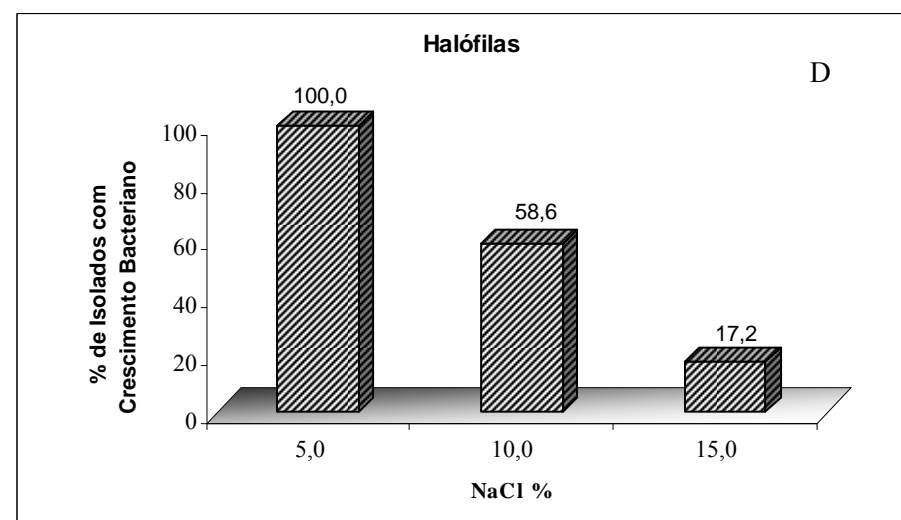
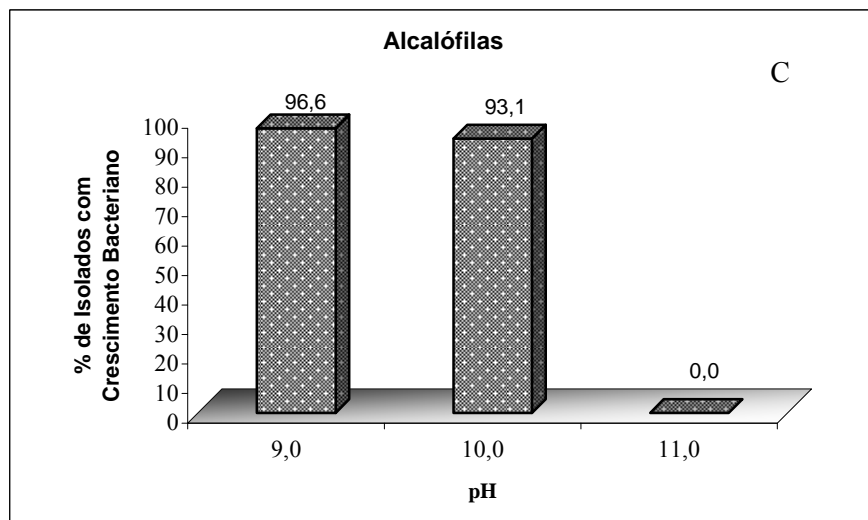
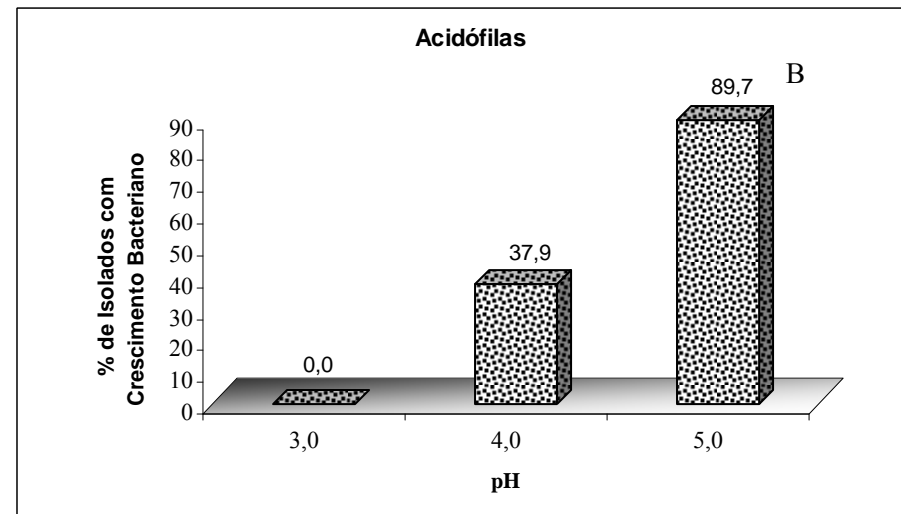
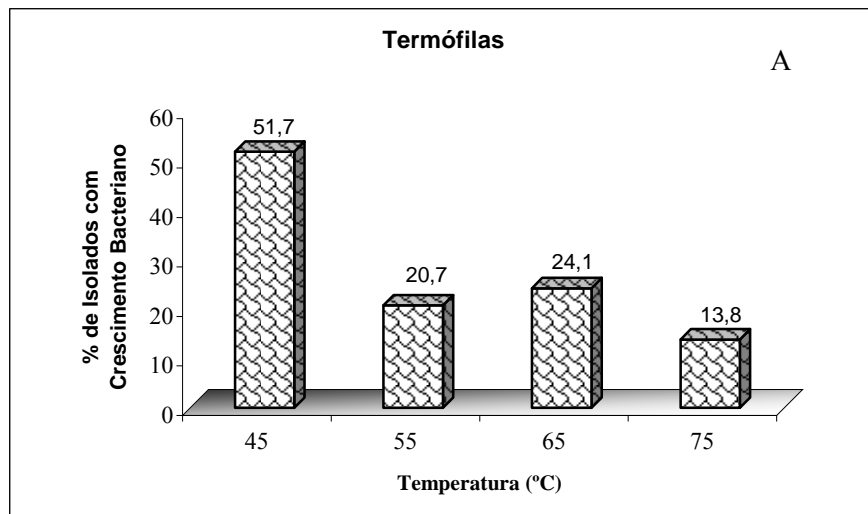
\* SNC- Solo Não Cultivado; \*\* SC- Solo Cultivado



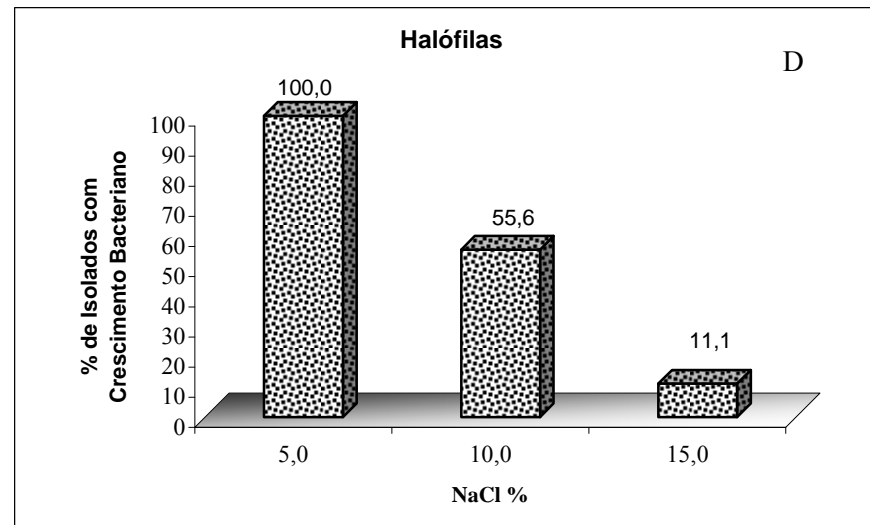
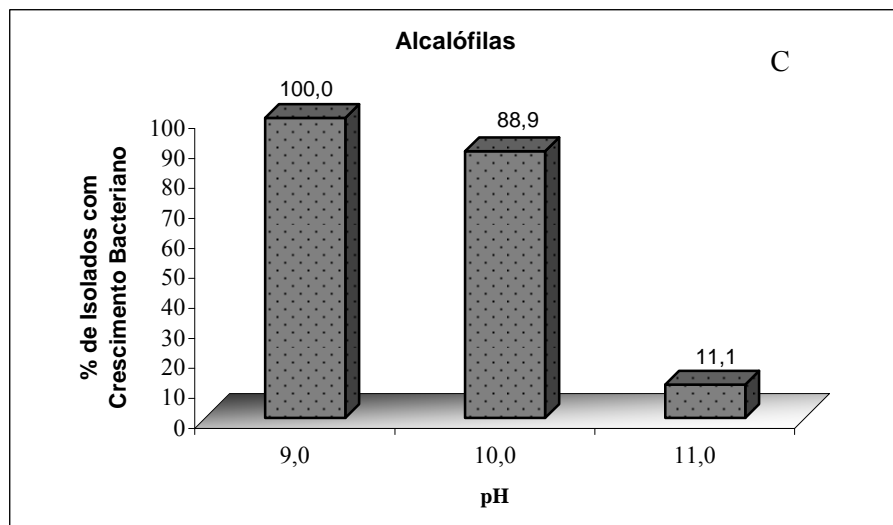
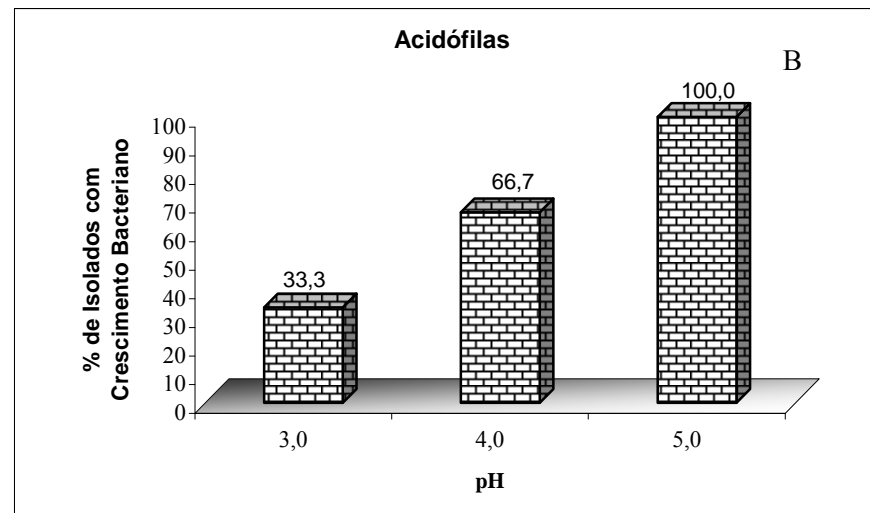
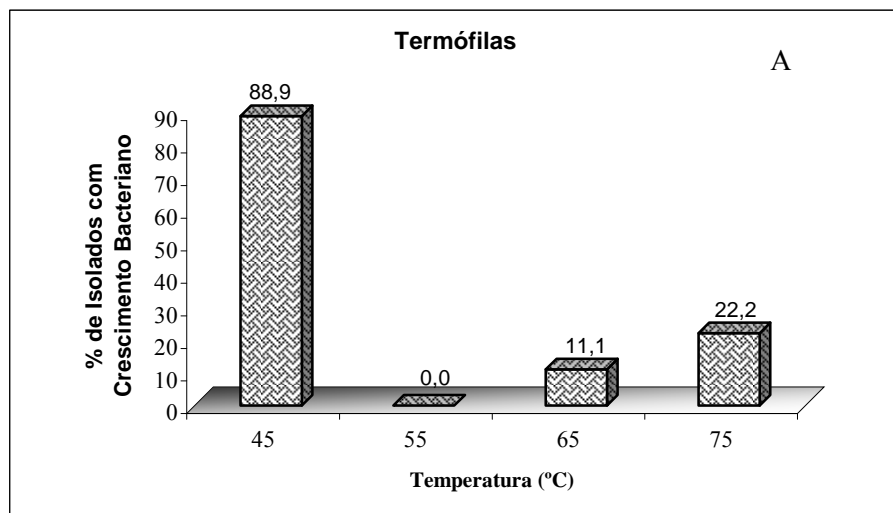
### **3.2- Determinação dos grupos de bactérias em condições extremas de temperatura, pH e salinidade**

No grupo das termófilas, em solos cultivados, observou-se que mais da metade dos isolados cresceram a 45 °C; e em temperaturas mais elevadas observou-se, mesmo que em pequenas percentagens, 13,8% de isolados crescendo nestas condições (Figura 1.1A). No grupo das acidófilas não houve isolados que cresceram em pH 3, entretanto, 37,9% dos isolados cresceram em pH 4 (Figura 1.1B). Para valores superiores a este não são consideradas extremófilas, visto que a maioria tende a crescer em condições próximas à neutralidade. No grupo das alcalófilas 96,6% e 93,1% dos isolados cresceram em condições de pH 9 e 10, respectivamente; no entanto em valores superiores a estes não foi possível verificar crescimento (Figura 1.1C). Já no grupo das halófilas mais da metade dos isolados cresceram em 10% de NaCl e 17,2% dos isolados cresceram em condições mais extremas de salinidade (Figura 1.1D).

No grupo das termófilas, em solos não cultivados, verificou-se que 88,9% dos isolados cresceram em temperaturas de 45 °C e 22,2 % em 75 °C (Figura 1.2A). No grupo das acidófilas já foi possível observar que 33,3% dos isolados cresceram em condições mais extremas de pH e 66,7% em pH 4, em valores superiores a este 100% dos isolados cresceram nestas condições, o mesmo fato ocorrido em solos cultivados (Figura 1.2B). No grupo das alcalófilas observou-se que os isolados bacterianos cresceram em todas as condições de pH avaliados, principalmente em pH 11, com 11,1% de isolados crescendo nestas condições (Figura 1.2C). Já no grupo das halófilas também foi possível verificar que os isolados cresceram em todas as condições, inclusive em alta concentração de sal NaCl 15%, (Figura 1.2D).



**Figura 1.1-** Percentagem de isolados com crescimento bacteriano, obtidos de amostras de solos cultivados, em diferentes condições de: (A) temperatura, (B e C) pH e (D) NaCl.



**Figura 1.2-** Percentagem de isolados com crescimento bacteriano, obtidos de amostras de solos não cultivados, em diferentes condições de: (A) temperatura, (B e C) pH e (D) NaCl.

### **3.3- Isolados selecionados para estudos posteriores**

Os isolados obtidos para estudos posteriores foram selecionados principalmente nas características em comum de temperatura 45 °C, pH 10 e NaCl 5%, visto que nestas condições ocorreram ótimo crescimento na maioria das amostras de solos estudadas. Nas condições mais extremas verificou-se que alguns isolados não cresceram, por isto que a seleção foi mais direcionada para estas três primeiras características. Os isolados selecionados foram: UnB 1327 (CR2), UnB 1329 (CE3), UnB 1331 (CO2), UnB 1324 (CD2), UnB 1321 (BK8), UnB 1323 (BK5), UnB 1322 (CE10), UnB 1325 (MI2), UnB 1330 (BK1), UnB 1328 (BK6) e UnB 1326 (PI2) (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3-** Isolados selecionados em relação ao crescimento bacteriano, com base nas características em comum de temperatura, pH e salinidade.

Ordem	Isolados	Sigla	Temp. 45 °C	NaCl 5%	pH 10	pH 4	NaCl 10%
1	UnB 1327	CR2	2,12*	3,82	3,56	2,01	0,00
2	UnB 1329	CE3	0,92	3,86	3,89	0,04	0,97
3	UnB 1331	CO2	1,77	3,93	3,76	0,04	0,00
4	UnB 1324	CD2	1,44	2,20	3,84	1,81	0,18
5	UnB 1321	BK8	2,05	1,98	3,68	0,07	1,18
6	UnB 1323	BK5	2,01	1,67	3,88	0,09	0,97
7	UnB 1322	CE10	1,05	1,17	3,83	1,88	0,41
8	UnB 1325	MI2	1,83	1,79	1,50	1,30	0,50
9	UnB 1330	BK1	1,10	1,41	3,86	0,02	0,00
10	UnB 1355	PI1	0,58	3,69	1,67	0,05	0,06
11	UnB 1328	BK6	0,23	1,77	3,86	0,07	0,00
12	UnB 1326	PI2	0,78	1,78	1,61	1,65	0,09
13	UnB 1341	CO4	0,00	1,44	3,85	0,09	0,18
14	UnB 1339	BK4	0,38	0,15	3,85	0,01	1,14
15	UnB 1346	Ma s/ MO5	0,80	0,46	3,89	0,03	0,08
16	UnB 1335	CE6	0,00	1,44	3,72	0,03	0,04
17	UnB 1333	CE2	0,00	1,22	1,90	1,54	0,21
18	UnB 1343	Ma s/ MO1.2	0,49	1,68	1,93	0,07	0,18
19	UnB 1336	CE8.2	0,00	0,45	3,85	0,05	0,00
20	UnB 1357	CR3	0,00	1,60	1,98	0,60	0,03
21	UnB 1334	CE5	0,00	1,62	2,25	0,03	0,00
22	UnB 1352	Ma c/ MO2	0,14	1,59	1,52	0,58	0,00
23	UnB 1350	MI5	0,51	1,02	1,85	0,03	0,00
24	UnB 1353	Ma c/ MO3	0,92	0,35	1,43	0,00	0,58
25	UnB 1337	CE9.1	0,00	0,57	2,24	0,28	0,12
26	UnB 1345	Ma s/ MO4	0,00	0,57	2,24	0,13	0,12
27	UnB 1358	CR4	0,52	1,76	0,38	0,00	0,38
28	UnB 1354	Ma c/ MO4	1,01	1,53	0,07	0,00	0,18
29	UnB 1340	CO3	0,49	1,88	0,01	0,25	0,00
30	UnB 1349	MI4	0,00	1,58	0,12	0,03	0,84
31	UnB 1351	MI6	0,22	1,33	0,41	0,02	0,46
32	UnB 1332	CE1	0,00	1,27	0,21	0,02	0,83
33	UnB 1348	MI3	0,41	1,81	0,00	0,00	0,00
34	UnB 1342	Ma s/ MO1.1	0,00	0,58	1,54	0,05	0,00
35	UnB 1347	MI1	0,00	1,43	0,44	0,06	0,00
36	UnB 1344	Ma s/ MO3	0,03	0,64	1,03	0,02	0,19
37	UnB 1356	CR1	0,00	0,29	0,33	0,01	0,00
38	UnB 1338	CE9.2	0,00	0,21	0,00	0,02	0,00

\* Os valores significam crescimento bacteriano medidos na absorbância de 550 nm.

### 3.4- Caracterização bioquímica e morfológica

Com base em alguns testes bioquímicos e morfológicos, realizados normalmente para bactérias fitopatogênicas; verificou-se que todos os isolados obtidos de diferentes amostras de solos, nenhum isolado apresentou reação positiva para a produção de endosporos, ou seja, não há isolados bacterianos formadores de esporos (Tabela 1.4).

No teste O/F, 34,21% dos isolados apresentaram metabolismo fermentativo (Tabela 1.4), indicando a característica anaeróbica facultativa, ou seja, a utilização de glicose na ausência ou presença de oxigênio. Bactérias fermentativas produzem reação ácida, na ausência de oxigênio, indicando uma coloração amarela do meio.

Para os testes de coloração de Gram, asparagina e catalase, observou-se que mais da metade dos isolados 63,16%, 71,06% e 84,84%, respectivamente, apresentaram reação positiva a estes testes. No entanto, nos testes de King-B e oxidase, somente dois isolados (UnB 1329 e UnB 1328) e cinco isolados (UnB 1329, 1331, 1330, 1328 e 1357), respectivamente, mostraram esta mesma reação (Tabela 1.4).

No teste King-B, embora os isolados confirmassem a produção de pigmentos fluorescentes, o isolado UnB 1329 mostrou uma pigmentação mais forte, com mais brilho comparado ao isolado UnB 1328; ao mesmo tempo em que as características morfológicas das colônias foram bastante diferentes, o isolado UnB 1329 apresentou uma coloração da colônia creme; enquanto que o isolado UnB 1328 mostrou uma coloração marrom-esverdeada, com um odor característico, confirmando que são espécies distintas.

Quanto à coloração das colônias dos demais isolados, a maioria apresentou uma coloração creme, sendo que alguns mostraram pigmentação rosa, UnB 1322 e 1333, colônias alaranjadas como UnB 1331, 1334, 1347 e 1356; amarela UnB 1336, 1348 e 1342; branca UnB 1349 e 1351 (Tabela 1.4).

**Tabela 1.4-** Caracterização bioquímica e morfológica dos isolados obtidos de condições extremas.

Isolados	Sigla	O/F	Gram	King-B	Asparag.	Catalase	Oxidase	Prod. Endosp.	Color. colônia	Células
UnB 1327	CR2	F	-	-	+	+	-	-	Creme clara	B*
UnB 1329	CE3	O	-	+	+	+	+	-	Creme	B
UnB 1331	CO2	O	-	-	-	+	+	-	Alaranjada	B
UnB 1324	CD2	F	-	-	+	+	-	-	Creme clara	C/B
UnB 1321	BK8	F	-	-	+	+	-	-	Creme	C/B
UnB 1323	BK5	F	-	-	+	+	-	-	Creme	C/B
UnB 1322	CE10	F	-	-	+	+	-	-	Creme/rosa	C
UnB 1325	MI2	F	-	-	+	+	-	-	Creme clara	B
UnB 1330	BK1	O	-	-	+	+	+	-	Creme	E
UnB 1355	PI1	F	-	-	+	+	-	-	Creme	C
UnB 1328	BK6	F	-	+	+	+	+	-	Marrom/verde	B
UnB 1326	PI2	F	-	-	+	+	-	-	Creme clara	B
UnB 1341	CO4	F	-	-	+	+	-	-	Creme	C/B
UnB 1339	BK4	O	-	-	+	+	-	-	Creme clara	C/B
UnB 1346	Ma s/ MO5	O	+	-	+	+	-	-	Creme/ branca	B
UnB 1335	CE6	O	+	-	+	+	-	-	Creme clara	C
UnB 1333	CE2	F	-	-	+	+	-	-	Creme / rosa	C
UnB 1343	Ma s/ MO1.2	F	-	-	+	+	-	-	Creme	C

Continuação...

UnB 1336	CE8.2	O	-	-	+	+	-	-	Amarela	B
UnB 1357	CR3	O	-	-	+	+	+	-	Creme clara	B
UnB 1334	CE5	O	-	-	-	+	-	-	Alaranjada	B
UnB 1352	Ma c/ MO2	F	-	-	+	+	-	-	Creme	B
UnB 1350	MI5	O	+	-	-	+	-	-	Creme/ cinza	B
UnB 1353	Ma c/ MO3	O	+	-	+	+	-	-	Creme	B
UnB 1337	CE9.1	O	+	-	-	-	-	-	Creme clara	C
UnB 1345	Ma s/ MO4	O	+	-	+	+	-	-	Creme clara	C
UnB 1358	CR4	O	+	-	+	+	-	-	Creme	B
UnB 1354	Ma c/ MO4	O	+	-	+	+	-	-	Creme	B
UnB 1340	CO3	O	+	-	-	-	-	-	Creme clara	C
UnB 1349	MI4	O	+	-	-	-	-	-	Branca	B
UnB 1351	MI6	O	+	-	+	+	-	-	Branca	B
UnB 1332	CE1	O	+	-	-	+	-	-	Creme escura	B
UnB 1348	MI3	O	+	-	-	+	-	-	Amarela	B
UnB 1342	Ma s/ MO1.1	O	-	-	-	-	-	-	Amarela	B
UnB 1347	MI1	O	-	-	-	+	-	-	Alaranjada	B
UnB 1344	Ma s/ MO3	O	-	-	-	-	-	-	Creme/amarela	B
UnB 1356	CR1	O	-	-	+	+	-	-	Alaranjada	C/B
UnB 1338	CE9.2	O	+	-	+	+	-	-	Creme clara	C

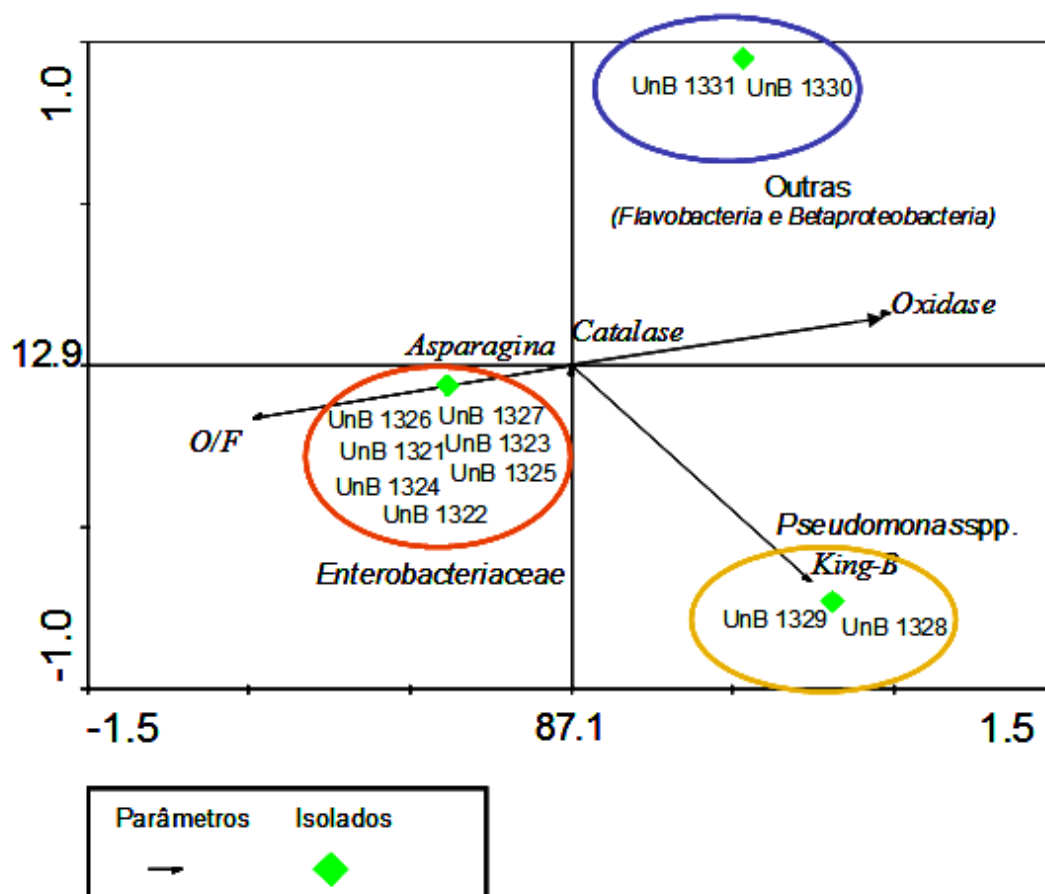
\*C-Cocos; B- Bastonetes; E- Espiraladas; sinal (+): positivo; sinal (-): negativo; (O) Oxidativo (F) Fermentativo



### 3.5- Seqüenciamento e filogenia dos isolados baseada em seqüências do gene 16S DNAr

Os dados obtidos no presente estudo possibilitaram tanto a diferenciação entre os distintos isolados, bem como deram base para a inferência filogenética dos grupos obtidos.

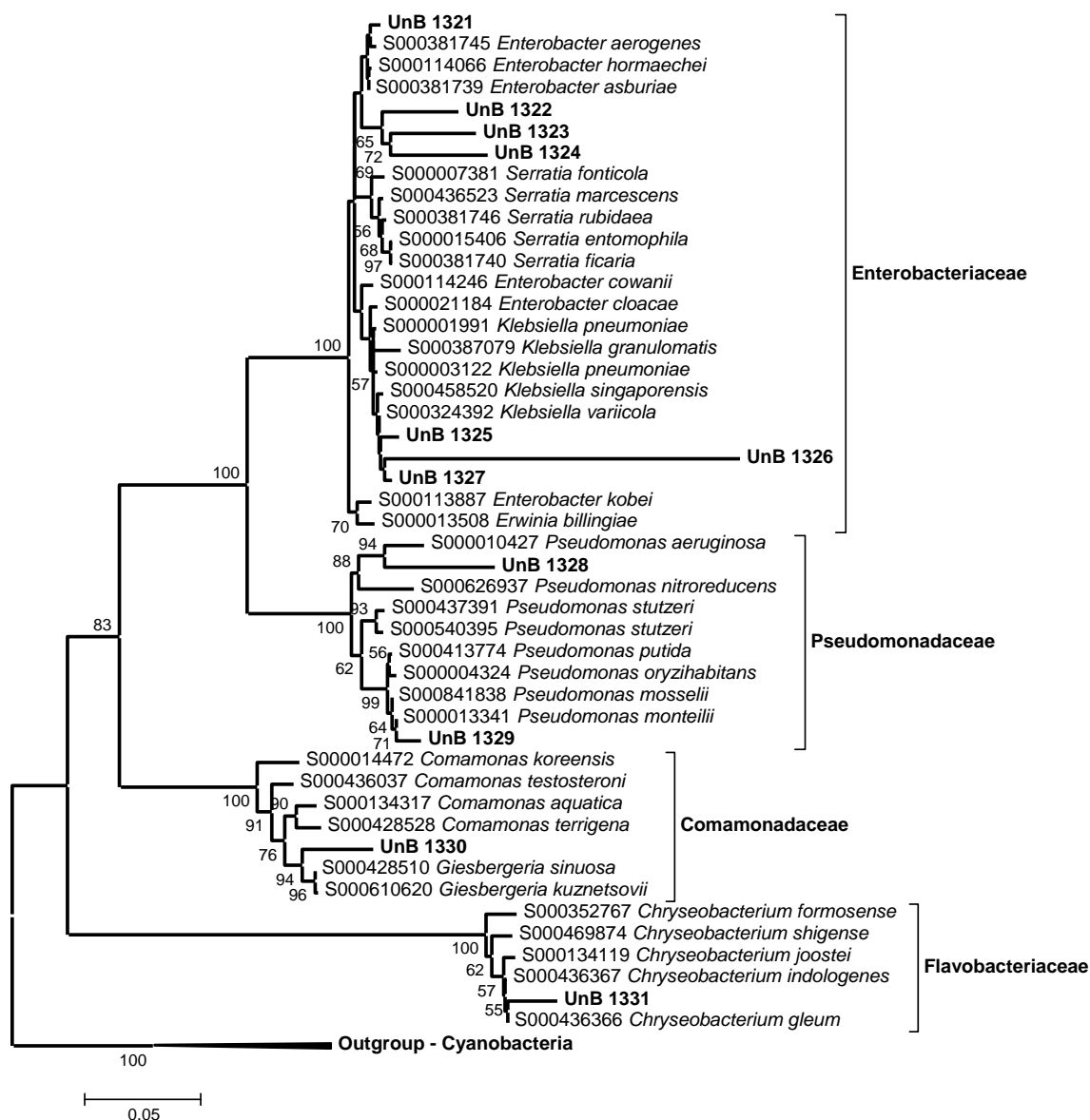
Analisando os dados dos testes bioquímicos por meio da aplicação da Análise de Componentes Principais (PCA), foi possível observar a formação de três grupos distintos, separados principalmente pelos testes de oxidação/fermentação de glicose, oxidase e pela capacidade em gerar colônias no meio de cultura King-B (Figura 1.3).



**Figura 1.3-** Análise de Componentes Principais (PCA) baseado nos perfis bioquímicos dos isolados analisados. Os valores indicam a percentagem da variância explicada nos eixos.

Relacionando tais resultados com os dados de sequenciamento, podemos concluir que dois destes grupos são também consistentes filogeneticamente. Os isolados que se desenvolvem em meio King-B (isolados UnB 1328 e UnB 1329) são afiliados taxonomicamente ao gênero *Pseudomonas*. Outro grupo formado foi alocado dentro da família Enterobacteriaceae, onde estão os isolados (UnB 1326, 1327, 1321, 1323, 1324, 1325 e 1322). Na PCA estes isolados mostraram ser positivos para a fermentação de glicose, mostrando a robustez dos dados e a congruência entre as análises genóticas e fenotípicas dos isolados analisados. O terceiro grupo observado na análise bioquímica mostrou a presença de dois isolados não relacionados taxonomicamente, sendo o isolado UnB 1330 e UnB 1331 similares bioquimicamente, mas classificados dentro dos grupos das Betaproteobacterias (isolado UnB 1330, afiliado ao gênero *Giesbergeria*) e Bacteroidetes (isolado UnB 1331, afiliado ao gênero *Chryseobacterium*).

Ainda analisando a filogenia dos isolados mais especificamente, temos que dentro do gênero *Pseudomonas*, o isolado UnB 1328 mostrou maior similaridade com *P. aeruginosa*, enquanto que o isolado UnB 1329 teve como melhor alocação filogenética a espécie *P. monteilli*. Dentro das Enterobacteriaceae subgrupos taxonômicos formados, sendo os isolados UnB 1321, 1323, 1324 e 1322 afiliados ao gênero *Enterobacter*, e os isolados UnB 1326, 1327 e 1325 associados ao gênero *Klebsiella* (Figura 1.4).



**Figura 1.4-** Filogenia dos isolados analisados no presente estudo. A filogenia é baseada na sequência parcial, sendo o alinhamento feito em 1377 pares de base do gene 16S DNAr. As sequências dos isolados foram avaliadas em relação à similaridade com as sequências presentes em banco de dados e foram correlacionadas com base no agrupamento por Neighbor-joining. Sequências de cianobactérias foram utilizadas como grupo externo, para enraizamento da árvore filogenética. Os valores de bootstrap também são apresentados, sendo calculados por 1000 subamostragens no grupo de sequências.

#### 4-DISCUSSÃO

Na determinação dos grupos de bactérias, verificou-se que em todas as amostras de solos não cultivados, nenhum dos isolados cresceram na condição de temperatura a 55 °C, no entanto apresentaram melhores crescimentos a 45 °C e 75 °C. Isto explica o nome dado ao trabalho de Bactérias Extremófilas Facultativas, visto que estas são capazes de crescerem tanto em ambientes amenos de temperatura, pH e salinidade propícias as bactérias mesófilas, quanto em condições mais extremas. Há, no entanto algumas bactérias que podem ser chamadas de “Bactérias Extremófilas Obrigatórias”, que estão presentes somente em ambientes extremos, como é o caso da *Pyrolobus fumarii*, isolada de fumarolas hidrotermais em Mid Atlantic Ridge, a qual não foi capaz de crescer em temperatura abaixo de 90 °C (Blöchl et al., 1997).

Em todas as amostras de solos, determinaram-se quatros grupos de bactérias extremófilas facultativas, verificando-se que muitas delas cresceram em condições de elevada temperatura (> 45 °C), ambientes ácidos (pH 3 e 4), ambientes muito alcalinos (pH 9 e 10) e altas concentrações de sal (10 e 15% de NaCl), fato não comumente encontrado para as bactérias fitopatogênicas do solo. Normalmente as bactérias que causam danos às plantas apresentam as seguintes condições ideais para o seu crescimento: temperaturas variando entre 25 e 40 °C (bactérias mesófilas), sendo que temperaturas muito altas podem provocar o dessecamento de células bacterianas (Bedendo, 1995); pH atingindo valores próximo à neutralidade 6,5 a 7,5 e a não tolerância em concentração de sal > 5% de NaCl. Segundo Nascimento et al. (2005) a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* decresceu a partir de 3,0% de NaCl, com concentração letal de 6,0%. Segundo os autores altas concentrações de NaCl tornam o ambiente hipertônico, devido a perda de água da célula, através da membrana plasmática, com conseqüente inibição do crescimento. Cavalcanti et al. (2005) também verificaram ausência de crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* nas concentrações de 6 e 7% de NaCl.

No grupo das termófilas, em todas as amostras de solos observou-se que em temperaturas mais elevadas há uma menor percentagem de isolados bacterianos crescendo nestas condições, comparados a temperatura de 45 °C. Estes dados corroboram com Gorch-Lira & Coutinho (2007) que verificaram em seus trabalhos um menor número de isolados bacterianos crescendo em temperaturas > 65 °C. Isto mostra que mesmo em pequenas percentagens, é possível encontrar bactérias termófilas

facultativas em diferentes tipos de solos relacionados à agricultura, sendo necessários mais estudos em outras faixas de temperaturas.

A maioria dos isolados bacterianos apresentaram bom crescimento em pH 9,0 e 10, pertencendo ao grupo das alcalófilas. Este dado confirma a descrição de Horikoshi (1999, 2004) que considera bactérias alcalófilas as que crescem em  $\text{pH} \geq 9,0$  com um ótimo crescimento próximo de pH 10. O pH ótimo para crescimento representa o pH externo à membrana plasmática, assim o pH interno das bactérias é diferente do pH externo, sendo que, internamente, o seu valor oscila entre 7 e 9. Segundo Horikoshi (1999, 2004) e Ramírez et al. (2006) a parede celular das bactérias pode desempenhar papel fundamental na proteção da célula neste ambiente, pois constituem polímeros ácidos que funcionam como uma matriz carregada negativamente os quais podem reduzir a densidade da carga na superfície celular através da adsorção de íons sódio e hidrogênio e expulsando os íons de hidróxido, como consequência ajuda as células a crescerem em ambientes alcalinos. Putnam (1995) citado por Estrela & Pécora (1997) mostram que o pH intracelular pode influenciar diferentes processos celulares, como: metabolismo celular; ativação do crescimento e proliferação celular; condutibilidade e transporte através da membrana; e volume celular isosmótico.

Nas amostras de solos não cultivados, observou-se uma pequena percentagem de isolados em pH mais extremos (pH 3), fato não ocorrido nas amostras de solos cultivados, provavelmente devido as amostras de composto orgânico e bokashi, onde foram encontrados estes isolados (dados não mostrados) há um maior período de decomposição dos materiais constituintes desta amostra. Entretanto, foi possível encontrar isolados com um bom crescimento em pH 4 em todas as amostras de solos.

No grupo das halófilas foi possível encontrar isolados, embora em pequenas percentagens, em 15% de NaCl. Segundo Ramírez et al. (2006) os microrganismos halófilos extremos sobrevivem em concentrações elevadas de sal  $> 20\%$ , concentrações  $> 10$  a  $20\%$  são considerados halófilos moderados. Entretanto, no que diz respeito à adaptação dessas bactérias em diferentes ambientes, Santos et al. (2001) e Ramírez et al. (2006), verificaram que há mecanismos diferentes de adaptação para as halófilas moderadas e extremas. Segundo os autores, as halófilas extremas acumulam no citoplasma íons inorgânicos ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) em concentrações elevadas para contrabalancearem a pressão osmótica externa e manterem a integridade celular. Enquanto, que as halófilas moderadas as estratégias de osmo adaptação são mais flexíveis, acumulam solutos compatíveis (aminoácidos, açúcares, glicina, betaina,

ectoína e hidroxiectoína) e compostos orgânicos de baixo peso molecular que mantém o equilíbrio osmótico sem interferir no metabolismo celular.

No estudo do sequenciamento e filogenia dos isolados, observou-se a formação de dois filos distintos, sendo que a maioria dos isolados pertenciam ao filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria e apenas um isolado ao filo Bacteroidetes, classe Flavobacteria. Com base nos testes bioquímicos de oxidação/ fermentação da glicose, oxidase e pela capacidade em formar colônias em meio King-B, esses filos foram agrupados em três grupos distintos, sendo que dois deles mostraram que os isolados estão relacionados taxonomicamente, enquanto que o outro grupo os isolados pertencem a filos completamente distintos.

De acordo com Pereira et al. (2006) estudando a diversidade de comunidades microbianas em solos cultivados e sob floresta, verificou-se que o filo Proteobacteria mostrou ser o maior e mais variado grupo de bactérias cultivadas, apresentando uma grande morfologia e diversidade metabólica. Quirino et al. (2009) em seus trabalhos da diversidade microbiana baseada no gene 16S rDNA, em solos de uma área do cerrado (stricto sensu) e uma área do cerrado convertida em pastagem, observaram-se o grupo mais abundante de bactérias identificados no solo do cerrado stricto sensu foi  $\alpha$ -Proteobacteria, enquanto no cerrado convertido em pastagens, os Actinobacteria foram mais abundantes. Outros estudos também têm observado a presença de ambos os filos em muitos ambientes diferentes (Borneman et al., 1996; Borneman & Triplett, 1997; Hugenholtz et al., 1998; Smit et al., 2001).

Na classe Gammaproteobacteria observou-se que os isolados estavam alocados em duas famílias distintas, sendo que os isolados (UnB 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326 e 1327) que apresentaram metabolismo fermentativo ao teste O/F, pertencem à família Enterobacteriaceae, enquanto que os isolados (UnB 1328 e 1329) que apresentaram desenvolvimento em meio King-B são afiliados taxonomicamente a família Pseudomonadaceae. Na classe Betaproteobacteria apenas o isolado UnB 1330 agrupado na família Comamonadaceae e o isolado UnB 1331 pertencendo ao filo Bacteroidetes, classe Flavobacteria, os dois últimos isolados apresentaram reação positiva ao teste de oxidase.

Verificou-se que todos isolados submetidos ao sequenciamento não foram possíveis identificar em nível de espécies, visto que são isolados obtidos de diferentes amostras de solos, a maioria não são cultiváveis e ainda não caracterizados, sendo possível a identificação apenas em nível de gênero. Os isolados UnB 1321, 1322, 1323

e 1324 estão afiliados ao gênero *Enterobacter*, sendo que o isolado UnB 1321 apresentou uma maior semelhança com a espécie *E. aerogenes*; enquanto que os isolados UnB 1325, 1326 e 1327 estão associados ao gênero *Klebsiella*, provavelmente mais relacionada a espécie *K. variicola*, não sendo conhecida a sua patogenicidade em plantas (Rosenblueth et al., 2004). Os isolados UnB 1328 e 1329 pertencem ao gênero *Pseudomonas*, sendo que o primeiro apresenta uma maior similaridade com *P. aeruginosa* e o segundo com *P. monteilii*. Os isolados alocados em um terceiro grupo com base no teste de oxidase, UnB 1330 pertencem ao gênero *Giesbergeria*, mais relacionada a espécie *G. sinuosa* (basinômio *Aquaspirillum sinuosum* Hylemon et al., 1973) e o isolado UnB 1331 ao gênero *Chryseobacterium*, maior similaridade com a *C. gleum* (basinômio *Flavobacterium gleum* Vandamme et al., 1994).

A maioria das espécies apresentadas anteriormente, como prováveis espécies dos isolados identificados são bactérias não fitopatogênicas, com exceção da *P. aeruginosa* que além de infectar insetos e nematóides, também causam sérios danos as raízes de *Arabidopsis* e manjerição doce (*Ocimum basilicum*) (Walker et al., 2004). As demais espécies foram isoladas de diferentes habitats, sendo mais comumente encontradas em fontes clínicas (Vandamme et al., 1994; Elomari et al., 1997; Grabovich et al., 2006).

Com bases nos resultados da identificação, observou-se que mesmo que alguns isolados apresentassem similaridade com algumas espécies fitopatogênicas, as mesmas não são capazes de crescerem em condições extremas, como mostradas no presente trabalho. É importante ressaltar que mesmo que tenham sido encontrados vários gêneros desses isolados, em solos agrícolas, até então não havia conhecimento dos mesmos adaptando condições mais extremas, sendo necessários mais conhecimentos do comportamento dessas bactérias no desenvolvimento das plantas e possivelmente um efeito supressivo de fitopatógenos.

## **5-CONCLUSÕES**

Solos cultivados e não cultivados podem-se determinar diferentes grupos de bactérias extremófilas e que dentro destes grupos é possível encontrar vários isolados que se adaptam em condições mais extremas de temperatura, pH e salinidade.

No estudo do sequenciamento e filogenia dos isolados determinou-se os isolados apenas em nível de gênero, são eles: *Enterobacter* spp. (UnB 1321, 1322, 1323 e 1324)

*Klebsiella* spp. (UnB 1325, 1326 e 1327) e *Pseudomonas* spp. (UnB 1328 e 1329) classe Gammaproteobacteria; *Giesbergeria* sp. (UnB 1330) classe Comamonadaceae, todos pertencendo ao filo Proteobacteria e o gênero *Chryseobacterium* sp. (UnB 1331) classe Flavobacteriaceae, filo Bacteroidetes, sendo que nenhum desses gêneros há relatos de serem bactérias extremófilas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Alexander M (1977) **Introduction to Soil Microbiology**. 2nd ed. New York. John Wiley.

Allison MF, Killham K (1988) Response of soil microbial biomass to straw incorporation. **Journal of Soil Science** 39:237-242.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215, 403-410.

Andrew CS (1962) Influence of nutrition on nitrogen fixation and growth of legumes. In: Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops. **A Review of Nitrogen in the Tropics with Particular Reference to Pastures**. Kew. CBPFC. pp.130-146.

Atlas M, Bartha R (1998) Microbial evolution and biodiversity. In: Atlas M, Bartha R **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science. pp.27-57.

Beare MH, Neely CL, Coleman DC, Hargrove WL (1990) A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford 22:585-594.

Bedendo IP (1995) Ambiente e doença. In: **Manual de Fitopatologia**. Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.). São Paulo. Ceres. pp.331-341.

Beffa T, Blanc M, Lyon PF, Vogt G, Marchiani M, Fischer JL, Aragno M (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 °C). **Applied and Environmental Microbiology** 62:1723-1727.

Bertol I, Leite D, Zoldan Júnior WA (2004) Decomposição do resíduo de milho e variáveis relacionadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 28:369-375.

Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. **Extremophiles** 1:14-21.

Borneman J, Skroch PW, O'sullivan KM, Palus JA, Rumjanek NG, Jansen JL, Nienhuis J, Triplett EW (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology** 62:1935-1943.

Bornemann J, Triplett EW (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology** 63:2647-2653.

Brandão EM (1992) Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: Cardoso EJB, Tsai SM, Neves MCP (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas. Sociedade Brasileira de Ciência do solo. pp.1-15.

Brown GG (2002) Papel das interações biológicas no funcionamento edáfico: Interações entre a fauna e os microrganismos do solo. In: FERTIBIO, Rio de Janeiro, **Anais, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. pp.1-4.

Cattelan AJ, Vidor C (1990) Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 14:125-132.

Cavalcanti MT, Silveira EB, Mariano RLR, Viana IO (2005) Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono. **Ciência Rural** 35:1313-1318.

Cheneby D, Philippot L, Hartmann A, Hénault C, Germon JC (2000) 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology** 34:121-128.

Cruz LEC, Costa JB, Morselli TBGA, Bruscatto AH (2007) Estudo da mesofauna em dois sistemas de produção na agricultura familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia** 2:1349-1353.

Denner EBM, McGenity TJ, Busse HJ, Grant WD, Wanner G, Stan-Lotter H (1994) *Halococcus salifodinae* sp. nov., an archaeal isolate from an Austrian salt mine. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:774-780.

Druschel GK, Baker BJ, Gihring TM, Banfield JF (2004) Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. **Geochemical Transactions** 5:13-32.

Elomari M, Coroler L, Verhille S, Izard D, Leclerc H (1997) *Pseudomonas monteilii* sp. nov., isolated from clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology** 47:846-852.

Estrela C, Pécora JD (1997) Mecanismos de ação do hidróxido de cálcio. <http://www.forp.usp.br/restauradora/calcio/mecan.htm>. Acesso em 03/ 09/ 2009.

Franco AA, Campello AFC, Dias LE, Faria SM (1994) Revegetation of acidic residues from bauxite mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. **Proceedings, Nitrogen Fixing Trees for Acid soils**, Turrialba, Costa Rica. pp.313-320.

Garcia FO, Rice CW (1994) Microbial biomass dynamics in tallgrass prairie. **Soil Science Society of America Journal** 58:816-823.

Godfroy A, Postec A, Raven N (2006) Growth of Hyperthermophilic Microorganisms for Physiological and Nutritional Studies. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** Vol.35. **Methods in Microbiology**. 1° Ed. Academic Press. pp.93-108.

Gorlach-Lira K, Coutinho HDM (2007) Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 38:135-141.

Grabovich M, Gavrish E, Kuever J, Lysenko AM, Podkopaeva D, Dubinina G (2006) Proposal of *Giesbergeria voronezhensis* gen. nov., sp. nov. and *G. kuznetsovii* sp. nov. and reclassification of [*Aquaspirillum*] *anulus*, [*A.*] *sinuosum* and [*A.*] *giesbergeri* as *Giesbergeria anulus* comb. nov., *G. sinuosa* comb. nov. and *G. giesbergeri* comb. nov., and [*Aquaspirillum*] *metamorphum* and [*A.*] *psychrophilum* as *Simplicispira metamorpha* gen. nov., comb. nov. and *S. psychrophila* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56:569-576.

Hoitink HAJ, Bohem MJ (1999) Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology** 37:93-114.

Höper H, Alabouvette C (1996) Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. **European Journal Soil Biology** 32:41-58.

Horikoshi K (1999) Alkaliphiles: Some Applications of their products for Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 63:735-750.

Horikoshi K (2004) Alkaliphiles. **Proceedings of the Japan Academy, Series B** 80:166-176.

Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology** 180:366-376.

Hylemon PB, Wells Junior JS, Krieg NR, Jannasch HW (1973) The genus *Spirillum*: a taxonomic study. **International Journal of Systematic Bacteriology** 23:340-380.

Ibrahim ASS, Ei-Shayeb NMA, Mabrouk SS (2007) Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian Soda Lake. **Journal of Applied Sciences Research** 11:1363-1368.

Ihara K, Watanabe S, Tamura T (1997) *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., two new extremely halophilic archaea collected in Argentina. **International Journal of Systematic Bacteriology** 47:73-77.

Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, Owenson GG (1998) Microbial diversity of soda lakes. **Extremophiles** 2:191-200.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969-976.

Kobayashi T, Kanai H, Hayashi T, Akiba T, Akaboshi R, Horikoshi K (1992) Haloalkaliphilic maltotriose-forming  $\alpha$ -amylase from the archaebacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. **Journal of Bacteriology** 174:3439-3444.

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings Bioinformatics** 5 (2), 150-163.

Lechevalier HA (1981) Criteria to be used in the description of new actinomycete. **Actinomycetes Related Organisms** 16: 46-48.

Liu S, Tang W (1996) The study on endophytic *Streptomyces* of cotton. In: Tang W, Cook RJ, Rovira A (Eds.) **Advances in Biological Control of Plant Diseases**. Beijing. China Agricultural University Press. pp.212-213.

Litchfield CD, Sikaroodi M, Gillevet PM (2006) Characterization of Natural Communities of Halophilic Microorganisms. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** Vol.35. **Methods in Microbiology**. 1<sup>o</sup> Ed. Academic Press. pp.513-533.

Louws FJ, Rademaker JLW, De Bruijn FJ (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology** 37:81-125.

Malavolta E (1980) **Elementos de Nutrição Mineral de Plantas**. São Paulo. Agronômica Ceres.

Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA (2005) Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano RLR, Silveira EB (Eds.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2ª edição. Recife: UFRP. pp. 67-.111.

Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA (2006) Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. **Extremophiles** 10:85-96.

Moreira FMS, Siqueira JO (2006) **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras MG. Editora UFLA. 716 p.

Neves O (2006) Componentes do Solo. [https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/54189/1/componentessolo\\_1.ppt](https://dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/54189/1/componentessolo_1.ppt). Acesso em 01/08/ 2009.

Niisawa C, Oka S, Kodama H, Hirai M, Kumagai Y, Mori K, Matsumoto J, Miyamoto H, Miyamoto H (2008) Microbial analysis of a composted product of marine animal resources and isolation of bacteria antagonistics to a plant pathogen from the compost. **Journal of General and Applied Microbiology** 54:149-158.

Nascimento ARP, Mariano RLR, Gama MAS (2005) Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira** 30:650-654.

Nuernberg NJ, Vidor C, Stammel JC (1984) Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 8:197-203.

Pereira JC, Neves MCP, Drozdowicz A (1999) Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34:801-811.

Pereira JC, Neves MCP, Gava CAT (2000) Efeito do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos do cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35:1183-1190.

Pereira RM, Silveira EL, Scaquitto DC, Pedrinho EAN, Val-Moraes SP, Wickert E, Carreto-Alves LM, Lemos EGM (2006) Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology** 37:439-447.

Quirino BF, Pappas GJ, Tagliaferro AC, Collevatti RG, Neto EL, Silva MRSS, Bustamante MMC, Krüger RH (2009) Molecular phylogenetic of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research** 164:59-70.

Rainey FA, Oren A (2006) Extremophiles microorganism and the methods to handle them. In: Rainey FA, Oren A (Eds.) **Extremophiles** vol.35. **Methods in Microbiology**. 1<sup>o</sup> Ed. Academic Press. pp.1-25.

Ramírez ND, Serrano JAR, Sandoval HT (2006) Microorganismos Extremófilos. Actinomicetos Halófilos en México. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas** 37:56-71.

Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** 66:2541-2547.

Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology** 27:27-35.

Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001) Life in extreme environments. **Nature** 409:1092-1101.

Santos H, Lamosa P, Costa MS (2001) Extremófilos: microorganismos à prova de agressões ambientais extremas. **Boletim de Biotecnologia** 69:1-10.

Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP, Zillig W (1995) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, Thermoacidophilic Genus and Family comprising Archaea capable of growth around pH 0. **Journal of Bacteriology** 177:7050-7059.

Silveira EL, Pereira RM, Scaquitto DC, Pedrinho EAN, Val-Moraes SP, Wickert E, Carreto-Alves LM, Lemos EGM (2006) Bacterial diversity of soil under eucalyptus

assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41:1507-1516.

Siqueira JO (1993) **Biologia do solo**. ESAL/ FAEPE. Lavras MG. 230p.

Smit E, Leeftang P, Gommans S, Broek JVD, Mil SV, Wernars K (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology** 67:2284-2291.

Souto PC, Souto JS, Miranda JRP, Santos RV, Alves AR (2008) Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 32: 151-160.

Stamford NP, Ortigas JAD, Temprano F, Santos DR (1997) Phosphorus fertilization and inoculation of *Bradyrhizobium* and mycorrhizal fungi on growth of mimosa caesalpiniaefolia in na acid soil. **Soil Biology & Biochemistry** 29: 959-964.

Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. **Federation of European Biochemical Societies Letters** 452:22-25

Vandamme P, Bernadet JF, Segers P, Kersters K, Holmes B (1994) New perspectives in the classification of the Flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology** 44:827-831.

Vargas LK, Selbach PA, Sá ELS (2004) Alterações microbianas no solo durante o ciclo do milho nos sistemas plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39:749-755.

Venugopalan V, Singh B, Verma N, Nahar P, Bora TC, Das RH, Gautam HK (2008) Screening of thermophiles from municipal solid waste and their selective antimicrobial profile. **Current Research in Bacteriology** 1:17-22.

Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM (2004) *Pseudomonas aeruginosa*- plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. **Plant Physiology** 134:320-331.

Watanabe K, Nagao N, Yamamoto S, Toda T, Kurosawa N (2007) *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting

reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57:1473-1477.

Wheatley R, Ritz K, Griffiths B (1990) Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. **Plant and Soil** 127:157-167.



### **BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS: EFEITO NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

#### **RESUMO**

Bactérias extremófilas facultativas foram obtidas de diferentes amostras de solos e submetidas às condições extremas de temperatura, pH e salinidade, e avaliadas na promoção do crescimento de plantas de tomate, em casa de vegetação. Foram realizados três experimentos, sendo que em cada um deles, com dois sistemas orgânicos: Composto Orgânico (CO) e Bokashi (BK), com delineamento inteiramente casualizado. A quantidade de tratamentos variou conforme o tipo de experimento, mas mantendo em todos 1 testemunha (não tratada) e 3 repetições. Assim, no experimento 1, com aplicação individual, 11 tratamentos (isolados), no experimento 2 (combinação de dois isolados) com 12 tratamentos e no experimento 3 (combinação de três e com todos simultaneamente) com 4 tratamentos. A inoculação dos isolados foi antes do transplante utilizando 100 mL de suspensão/bandeja (para os experim. 1 e 2) e 150 mL (experim. 3) na concentração de  $6 \times 10^8$  UFC/mL. A avaliação foi feita medindo a altura das plantas, iniciando aos 7 dias após o transplante (DAT) para experim. 1 e aos 14 DAT para os experim. 2 e 3. Em todos os experimentos foram avaliados o peso da matéria fresca (PMF) e seca (PMS). No experimento 1, os isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) em ambos os sistemas orgânicos, foram mais eficientes mostrando maiores incrementos na altura (ALT), PMF e PMS em relação à testemunha. Nos experimentos 2 e 3, a mistura de isolados não proporcionou maiores efeitos nos parâmetros avaliados, quando comparado com experimento 1, provavelmente por não ter ocorrido competição entre os isolados. Estudos posteriores deverão ser realizados para compreender melhor o papel dessas bactérias no desenvolvimento das plantas de tomate.

**Palavras-chave:** bactérias termófilas, bactérias alcalófilas, bactérias acidófilas, bactérias halófilas, promoção do crescimento, *Solanum lycopersicum*.

### FACULTATIVE EXTREMOPHILE BACTERIA: EFFECT ON GROWTH PROMOTION IN TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.)

#### ABSTRACT

Facultative extremophile bacteria were obtained from several soil samples and submitted to extreme conditions of temperature, pH and salinity, then being evaluated in growth promotion in tomato plants under greenhouse conditions. Three experiments were carried out, each one involving two organic systems, Organic Compost (CO) and Bokashi (BK), in an entirely randomized design. The number of treatments varied depending on the type of experiment, but all used 1 control (untreated) and 3 repetitions. There were, therefore, in experiment 1, with individual application, 11 treatments (isolates); in experiment 2 (combination of two isolates) 12 treatments; and in experiment 3 (combination of three and with all simultaneously) 4 treatments. Inoculation of the isolates took place before transplant using 100 mL of suspension/tray (for experiments 1 and 2) and 150 mL (experiment 3) at a concentration of  $6 \times 10^8$  UFC/mL. Evaluation was done by measuring the height of the plants, starting at 7 days after transplant (DAT) for experiment 1 and at 14 DAT for experiments 2 and 3. In all the experiments the mass of fresh material (FMM) and dry material (DMM) was measured. In both organic systems of experiment 1, isolates UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) and UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) were most efficient, showing greater increase in height (HEI), FMM and DMM than the control. In experiments 2 and 3, the mixture of isolates did not have a greater effect on the evaluated parameters, compared with experiment 1, probably because no competition took place between isolates. Further studies should be carried out to better understand the role of these bacteria in the development of tomato plants.

**Key words:** thermophilic bacteria, alkalophilic bacteria, acidophilic bacteria, halophilic bacteria, growth promotion, *Solanum lycopersicum*.

## 1 - INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), originário da América do Sul, é cultivado em quase todo o mundo, e sua produção global duplicou nos últimos 20 anos. Um dos principais fatores para a expansão da cultura é o crescimento do consumo. Entre 1985 e 2005, a produção mundial per capita de tomate cresceu cerca de 36%, passando de 14 kg por pessoa por ano para 19 kg. De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/ONU). Recentemente, a demanda por tomate foi reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis, favorecendo também o crescimento da venda do produto fresco. O tomate é um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno, substância que ajuda na prevenção de cânceres relacionados ao aparelho digestivo (Carvalho & Pagliuca, 2007).

Atualmente, a busca por aumento na produção das culturas tem sido o alvo de muitos pesquisadores, melhoristas e produtores. Com o desenvolvimento de uma agricultura mais moderna, buscando novos conhecimentos e mais tecnologias, vários pesticidas estão no mercado, em decorrência do aumento da área cultivada e, conseqüentemente do controle de doenças, pragas e plantas daninhas. Embora o uso desses pesticidas tenha contribuído para aumentar a produtividade das culturas, por outro lado têm gerado sérios problemas ao meio ambiente. Assim, o grande desafio da agricultura mundial é aumentar a produção das culturas e ao mesmo tempo diminuir a poluição ambiental. Nesse contexto a possibilidade de incorporar às práticas agronômicas rotineiras, juntamente com a aplicação de microrganismos inoculantes, conhecidos como biofertilizantes, surge como uma alternativa viável para conseguir atingir esse objetivo.

De acordo com Vessey (2003) os biofertilizantes são substâncias que contêm microrganismos vivos que, quando aplicadas às sementes, as superfícies das plantas ou no solo, colonizam a rizosfera e, ou interior das plantas e promovem o crescimento, aumentando a disponibilidade de nutrientes primários para planta hospedeira. Segundo o autor enquadram no conceito as PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR). De acordo com Bashan (1998) citado por Silveira (2001) foi proposto uma nova terminologia para melhor classificar essas bactérias, sendo que o termo rizobactérias seria substituído por bactérias, uma vez que nem todas as bactérias colonizam a raiz, surgindo duas denominações: “biocontrol plant growth-promoting bacteria- biocontrol

PGPB” (bactérias promotoras de crescimento de plantas biocontroladoras) e “plant growth-promoting bacteria-PGPB” (bactérias promotoras de crescimento de plantas); no entanto essa terminologia não vem sendo utilizada.

Para que uma rizobactéria seja considerada uma verdadeira PGPR, deve ser capaz de colonizar o sistema radicular da planta. Estas se nutrem de exsudatos radiculares, como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, e encontram-se no rizoplane, nichos ecológicos, onde se estabelecem e protegem do antagonismo da microbiota circunvizinha (Romeiro, 2007).

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e exterior de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras de crescimento de plantas fazem parte da população residente das plantas como epífitas ou endofíticas e não são fitopatogênicas (Mariano et al., 2004). Hallmann et al. (1997), conceitua bactérias epifíticas as encontradas na superfície de órgãos vegetais, sobrevivendo em locais protegidos utilizando exsudatos e nutrientes. Enquanto que as bactérias endofíticas podem ser isoladas de tecidos vegetais desinfestados ou extraídas de dentro da planta; sendo que ambas não causam prejuízo visível à mesma.

Os principais efeitos observados na promoção de crescimento das plantas são aumento da taxa de germinação, aumento do número de folhas e área foliar, crescimento de tubérculos e do caule, aumento de flores e aumento do rendimento (Silveira, 2001). Segundo Romeiro (2007), o parâmetro mais comum de se avaliar no campo é a produtividade; enquanto que nos ensaios em casa de vegetação atêm-se parâmetros típicos, como aumento do poder germinativo e tempo para germinação das sementes, altura da planta, número de folhas, exame dos tratamentos para detecção de sintomas de carência nutricional, área foliar, tempo para floração e frutificação, pesos da matéria seca ou fresca, teores de clorofila e composição química da planta.

Bactérias endofíticas promovendo crescimento de plantas já foi observado em diversas culturas, como: beterraba (Shi et al., 2009), arroz (Mano & Morisaki, 2008), tomate (Pillay & Nowak, 1997; Nejad & Johnson, 2000; Barreti et al., 2008), alface (Gomes et al., 2003), algodão (Musson et al., 1995) e também em planta ornamental, como helicônia (Santos et al., 2005). Já as PGPR's há um maior número de relatos, envolvendo desde espécies florestais (Pereira et al., 2008), plantas cítricas (Freitas & Vildoso, 2004), grandes culturas, como feijão (Mendonça, 2006), trigo (Saubidet et al., 2002), arroz (Alam et al., 2001), cana-de-açúcar (Mirza et al., 2001), milho (Pandey et al., 1998) e soja (Dashti et al., 1997), e algumas olericulturas como pepino (Lucon et al.,

2008), tomate e espinafre (Adesemoye et al., 2008), batata (Frommel et al., 1991) e outros mais.

Lucy et al. (2004) dividem os possíveis efeitos benéficos de PGPR's para plantas em diretos e indiretos. Quanto aos mecanismos direto incluem a solubilização de fosfatos, fixação de N para o uso em plantas, a fixação de ferro como usinas de sideróforos, produção de hormônios vegetais, como auxinas, citocininas e giberilinas e redução dos níveis de etileno. Mariano et al. (2004) são mais detalhados em organizar os efeitos indiretos quando a planta está sendo infectada por um patógeno, e as bactérias promotoras de crescimento de plantas atuam como agentes de controle biológico através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço,  $Fe^{+3}$  e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada.

Assim como as PGPR's e as bactérias endofíticas que têm proporcionado vários benefícios, seria interessante o conhecimento de outros microrganismos capazes de promoverem o crescimento das plantas, como as bactérias extremófilas que proliferam numa variedade de ambientes caracterizados por extremos de temperatura, pH, salinidade e outros mais. Essas bactérias são comumente encontradas em ambientes, aparentemente inóspitos a outros microrganismos adaptados a um ambiente mais ameno. Segundo Ramírez et al. (2006), estas bactérias podem ser encontradas em fontes termais vulcânicas terrestres, fumarolas hidrotermais, compostos em fermentação, regiões polares, fundos dos oceanos, em lagos com alta concentração de sal, nas salinas, alimentos salgados, ambientes ácidos que ocorrem produção de gases sulfurosos, de origem vulcânicas, lagos sódios, com alta concentração de carbonato de sódio, e outros mais.

Trabalhos envolvendo estas bactérias já foram estudados por vários autores, com isolamento em diferentes ambientes: Scheleper et al. (1995) bactérias acidófilas de origens vulcânicas em pH próximo de 0; Jakobsen et al. (2006) bactérias halófilas de regiões quentes e secas, como os lagos salinos; Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya (2006) bactérias termófilas e hipertermófilas de fontes termais submarinas; Watanabe et al. (2007) bactéria termófila com crescimento a 50 °C, de um reator de compostagem de uso doméstico; Joshi et al. (2008) bactérias alcalófilas em lagos com alta concentração de carbonato de sódio, com crescimento em pH variando de 9-12. No entanto, pouco se conhece a respeito dessas bactérias na agricultura. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi estudar bactérias extremófilas facultativas, com efeito na promoção do crescimento das plantas de tomate, em casa de vegetação.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, da Estação Experimental de Biologia e no Laboratório de Fitopatologia, ambos pertencentes à Universidade de Brasília (UnB), no período de agosto de 2008 a agosto de 2009.

Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo foram obtidos de amostras de solos coletadas no Centro de Produção de Agricultura Natural MOA, localizada no município de Brazlândia, DF, testados em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (como visto no capítulo 1) e enviados para a empresa In Vitro Palm Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico LTDA, situada em Piracicaba- SP, para identificação dos isolados a nível de gênero. A origem dos isolados, assim como a sua identificação estão apresentados na (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** - Isolados bacterianos, de condições extremas, utilizados no presente estudo.

<b>Isolados</b>	<b>Família</b>	<b>Gênero</b>
UnB 1321	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1322	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1323	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1324	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.
UnB 1325	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> sp.
UnB 1326	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> sp.
UnB 1327	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> sp.
UnB 1328	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
UnB 1329	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i> sp.
UnB 1330	Comamonadaceae	<i>Giesbergeria</i> sp.
UnB 1331	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i> sp.

Foram realizados três experimentos para estudar o efeito dos isolados individuais e combinado, na promoção do crescimento das plantas de tomate. Todos os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, e o plantio foi realizado com sementes de tomate da cv. Santa Cruz Kada Gigante, considerada suscetível, em bandejas de isopor com 200 células, contendo o substrato Plantmax ®.

## **2.1 - Preparo das bandejas**

Para cada experimento foram estudados dois tipos de sistemas orgânicos: um com Composto Orgânico (CO) e o outro com Bokashi (BK). Preparou-se bandejas de polietileno, nas quais foram colocadas 4,5 L de solo da Estação Experimental de Biologia da UnB (Latosolo Vermelho- LV) e mais os CO e BK na quantidade de 2,0 e 0,5%, respectivamente.

## **2.2 - Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.**

Este experimento foi realizado do dia 08 de agosto a 30 de setembro de 2008. O objetivo foi avaliar o efeito de cada isolado, na promoção do crescimento das plantas de tomate, em dois sistemas orgânicos. Para cada sistema estudado CO e BK, foi realizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com onze tratamentos que foram os isolados, uma testemunha, com três repetições.

Após o preparo das bandejas, conforme o item 2.1 foi realizada a inoculação dos isolados bacterianos, que haviam crescidos em meio sólido 523 (Kado & Heskett, 1970) com 48 horas. Preparou-se 100 mL de suspensão na concentração bacteriana determinada pela medida da absorbância a 550 nm (Abs. = 0,7 a 0,8), que refere-se à concentração de  $6 \times 10^8$  UFC/mL em espectrofotômetro digital UV-1203 (Shimazu Corporation) (Mariano & Silveira, 2005) que foi a concentração da suspensão bacteriana utilizada no experimento.

Os isolados foram inoculados nas bandejas que continham solo (LV) juntamente com o sistema orgânico (CO/BK) previamente esterilizado. Após a inoculação dos isolados prosseguiu-se com a etapa do transplante das mudas de tomate que foi realizada entre 15 e 20 dias após a germinação (DAG) dependendo das condições climáticas (temperatura e luminosidade), quando estas apresentavam de 3 a 5 folhas definitivas, transplantando dez mudas em cada bandeja.

As avaliações foram realizadas semanalmente, com 7, 14, 21 e 28 dias após o transplante (DAT), medindo a altura de cada planta desde a base até a última brotação. Os dados gerados foram submetidos à análise de variância, no programa ASSISTAT

versão 7.5 beta (2008) (Silva, 2009). As variáveis, cujos efeitos de tratamentos foram significativos, foram submetidas ao teste Duncan a 5% de probabilidade.

### **2.3 - Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.**

O experimento foi realizado do dia 02 de junho a 28 de julho de 2009. O objetivo foi avaliar o efeito da combinação de dois isolados, na promoção do crescimento das plantas de tomate, em dois sistemas orgânicos. A combinação dos isolados bacterianos foi com base nos resultados do experimento 1. Assim cada letra representando diferenças significativas, com base no teste de agrupamento de Scott-Knott aos 28 DAT, foi atribuída uma escala de crescimento variando de ótimo a ruim. Como em ambos os sistemas CO e BK, as médias foram diferentes, as combinações dos isolados também não foram as mesmas. Sendo assim, no sistema CO foi realizado sete diferentes combinações: 1- OO (crescimento ótimo + ótimo), 2- OB (ótimo + bom), 3- BB (bom + bom), 4- BI (bom + intermediário), 5- II (intermediário + intermediário), 6- IR (intermediário + ruim) e 7- OR (ótimo + ruim), dessas combinações obteve-se doze combinações de isolados: **1-** UnB 1327 + UnB 1324 (OO), **2-** UnB 1327 + UnB 1330 (OB), **3-** UnB 1324 + UnB 1323 (OB), **4-** UnB 1330 + UnB 1329 (BB), **5-** UnB 1323 + UnB 1322 (BI), **6-** UnB 1329 + UnB 1321 (BI), **7-** UnB 1322 + UnB 1325 (II), **8-** UnB 1321 + UnB 1331 (II), **9-** UnB 1325 + UnB 1328 (II), **10-** UnB 1331 + UnB 1326 (IR), **11-** UnB 1328 + UnB 1326 (IR) e **12-** UnB 1327 + UnB 1326 (OR). Já no sistema BK as sete diferentes combinações foram: 1- OB (ótimo + bom), 2- BB (bom + bom), 3- BI (bom + intermediário), 4- II (intermediário + intermediário), 5- IR (intermediário + ruim), 6- RR (ruim + ruim) e 7- OR (ótimo + ruim) dessa forma resultou nas seguintes combinações de isolados: **1-** UnB 1327 + UnB 1324 (OB), **2-** UnB 1327 + UnB 1321 (OB), **3-** UnB 1324 + UnB 1328 (BB), **4-** UnB 1321 + UnB 1326 (BB), **5-** UnB 1328 + UnB 1329 (BI), **6-** UnB 1326 + UnB 1330 (BI), **7-** UnB 1329 + UnB 1322 (II), **8-** UnB 1330 + UnB 1323 (II), **9-** UnB 1322 + UnB 1331 (IR), **10-** UnB 1323 + UnB 1325 (IR), **11-** UnB 1325 + UnB 1331 (RR) e **12-** UnB 1327 + UnB 1331 (OR). Para cada sistema estudado CO e BK foram realizados o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com doze tratamentos que foram as combinações dos isolados, mais uma testemunha, sendo Test. (LV + CO ou BK), com três repetições.



Todos os procedimentos do preparo das bandejas estão descritos no item 2.1. Após esta etapa foi realizada a inoculação dos isolados bacterianos, a suspensão preparada para a combinação de dois foi de 100 mL, sendo 50 mL para cada isolado. Toda a parte de inoculação, transplante das mudas de tomate e avaliação, foram semelhantes à metodologia do experimento 1, sendo que a primeira avaliação iniciou-se aos 14 DAT.

Os dados gerados foram submetidos à análise de variância, no programa ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) (Silva 2009). As médias entre os tratamentos foram realizadas pelo teste t, a 5% de probabilidade.

#### **2.4 - Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos os isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.**

O experimento foi realizado do dia 25 de junho a 25 de agosto de 2009. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da combinação de três isolados e com todos os onze isolados inoculados simultaneamente, para verificar a promoção do crescimento das plantas de tomate, em dois sistemas orgânicos. A combinação de três isolados foi realizada com base nos resultados do experimento 1. Assim formaram-se três combinações diferentes, com três isolados sendo: 1- com maiores médias, 2- com médias intermediárias e 3- com menores médias; para ambos os sistemas CO e BK. Com base nesta descrição foi possível formar a seguinte combinação de isolados, para o sistema CO: **1-** UnB 1327 + UnB 1324 + UnB 1330, **2-** UnB 1322 + UnB 1321 + UnB 1325 e **3-** UnB 1331 + UnB 1326 + UnB 1328; e para o sistema BK: **1-** UnB 1327 + UnB 1324 + UnB 1321; **2-** UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 e **3-** UnB 1331 + UnB 1325 + UnB 1323.

Para cada sistema estudado CO e BK foram realizados o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos que foram a combinação de três isolados e mais uma combinação de onze isolados simultaneamente, mais uma testemunha, sendo Test. (LV + CO ou BK), com três repetições.

Todos os procedimentos do preparo das bandejas estão descritos no item 2.1. A inoculação dos isolados bacterianos, foi feita a partir da suspensão preparada de 150 mL, sendo 50 mL para cada isolado; enquanto que no tratamento com todos os isolados foi usado 165 mL/ bandeja, ou seja, 15 mL para cada isolado. Toda a parte de

inoculação, transplante das mudas de tomate e avaliação, foram semelhantes à metodologia do experimento 1, sendo que a primeira avaliação iniciou-se aos 14 DAT.

A análise estatística foi semelhante ao experimento 2, usando o teste t a 5% de probabilidade.

## **2.5 - Determinações da matéria fresca e seca das plantas de tomate**

Ao término das avaliações da altura, em cada experimento, foram coletadas cinco plantas/ bandeja aleatoriamente, de cada repetição, em seguida lavadas em água corrente e submetidas à pesagem para a determinação do peso fresco. Posteriormente, foram acondicionadas em saco de papel separadamente, para perder a umidade, depois levados a estufa (70 °C) por 72 horas para determinação do peso seco, sendo pesadas em balança digital.

## **2.6 - Bioensaio de solubilização de fosfatos com os isolados bacterianos providos de condições extremas**

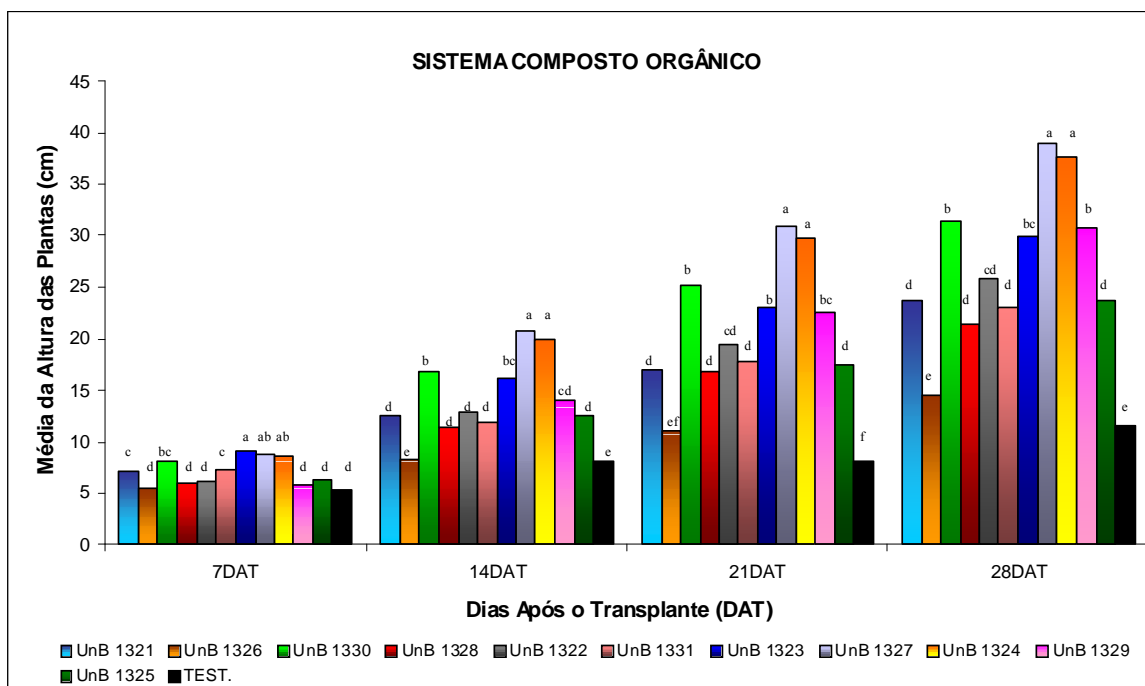
Muitos microrganismos no solo possuem a capacidade de mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos permitindo a liberação do fósforo assimilável pelas plantas. Assim o objetivo deste ensaio foi verificar quais isolados bacterianos, obtidos de condições extremas são solubilizadores de fosfato. Em placas de Petri de 90 mm Ø, com meio de cultura contendo fosfato insolúvel  $\text{CaHPO}_4$  (Cattelan, 1999, adaptado de Katznelson & Bose, 1959), os isolados bacterianos foram repicados, em pontos equidistantes, e posteriormente incubados a 28 - 30 °C. No decorrer do período de incubação por sete dias, verificaram-se as colônias formarem halo claro ao seu redor. Segundo Kang et al. (2002) a solubilização de fosfato em meio sólido pode ser avaliada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, em contraste com meio opaco. Todos os trinta e oito isolados (apresentados no capítulo 1) foram testados, e para cada um foram feitas duas repetições.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.

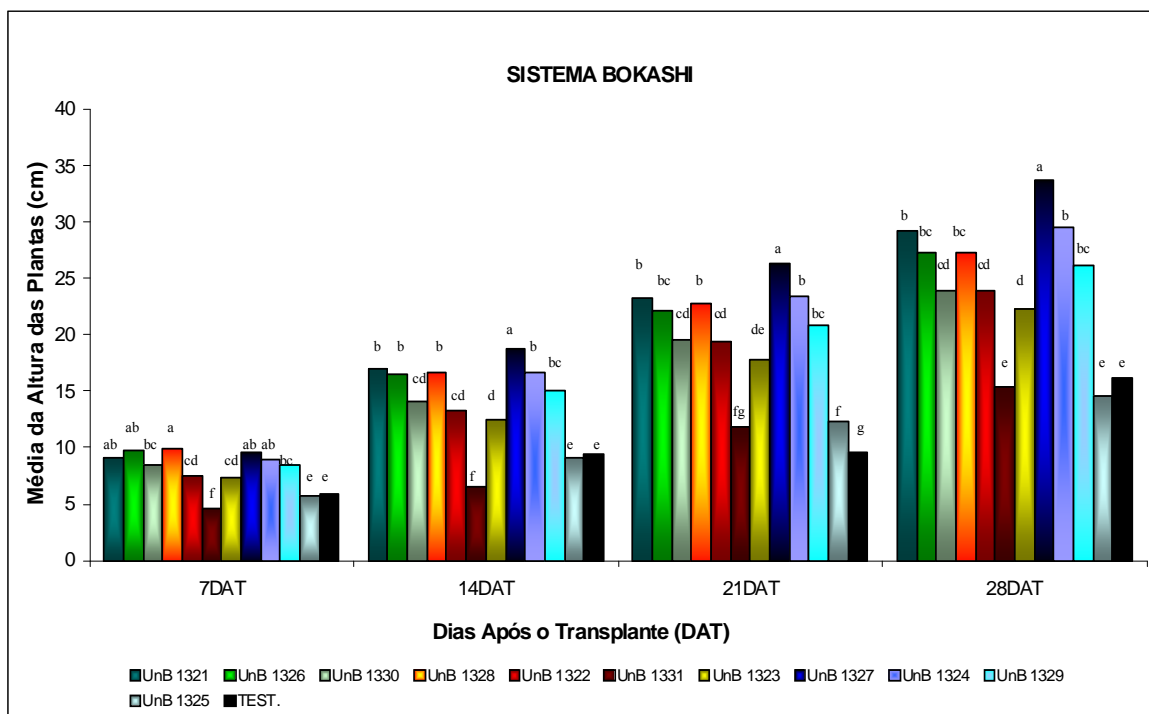
Estudando o efeito dos isolados aplicados individualmente, em ambos os sistemas orgânicos composto (CO) e bokashi (BK), verificou-se que a maioria destes diferiram significativamente da testemunha, em todas as avaliações. Isto mostra que os isolados bacterianos que cresceram em condições extremas quando aplicados isoladamente são promotores de crescimento em plantas de tomate, avaliados em casa de vegetação.

No sistema CO aos 7 DAT os isolados UnB 1323 (*Enterobacter* sp.), 1327 (*Klebsiella* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.) foram significativamente semelhantes, sendo que o UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, apresentando maior média de crescimento; no entanto os tratamentos UnB 1326 (*Klebsiella* sp.), 1328 (*Pseudomonas* sp.), 1322 (*Enterobacter* sp.), 1329 (*Pseudomonas* sp.) e 1325 (*Klebsiella* sp.) foram significativamente semelhantes à testemunha, com menores médias de crescimento. Aos 14 DAT os isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.) permaneceram com as maiores médias até o final da avaliação diferindo de todos os tratamentos, enquanto que o UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) foi o único a apresentar menor crescimento semelhante à testemunha. Com 28 DAT verificou-se crescimento das plantas, principalmente dos tratamentos com os isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.) apresentando uma média de 38,9 cm e 37,6 cm, respectivamente, em relação à testemunha com menor média 11,6 cm (Figura 2.1).



**Figura 2.1** - Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento individual, com avaliação semanal, no sistema Composto Orgânico. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergia* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

No sistema Bokashi aos 7 DAT, o isolado UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.) diferiu significativamente do isolado UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.), sendo que este último apresentou menor média da altura das plantas, estatisticamente semelhante ao isolado UnB 1325 (*Klebsiella* sp.). O UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.) não diferiu dos tratamentos UnB 1321 (*Enterobacter* sp.), 1326 (*Klebsiella* sp.), 1327 (*Klebsiella* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.). No entanto, aos 14 DAT o UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) que se destacou na primeira semana, manteve a maior média na altura das plantas até o final das avaliações diferindo significativamente de todos os demais tratamentos. Enquanto os isolados UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) e 1325 (*Klebsiella* sp.) apresentaram menores médias, sendo este último estatisticamente semelhantes à testemunha. Na última avaliação o isolado UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) apresentou maior média na altura das plantas com 33,7 cm em relação a testemunha com 16,2 cm (Figura 2.2).



**Figura 2.2-** Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento individual, com avaliação semanal, no sistema Bokashi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

### 3.2 - Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.

A combinação desses isolados como já mencionada (item 2.3) foi com base nos resultados do experimento 1, em que foi realizado o teste de agrupamento Scott-Knott conforme mostra a Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** - Médias da altura das plantas, obtidas com 28 DAT, realizadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

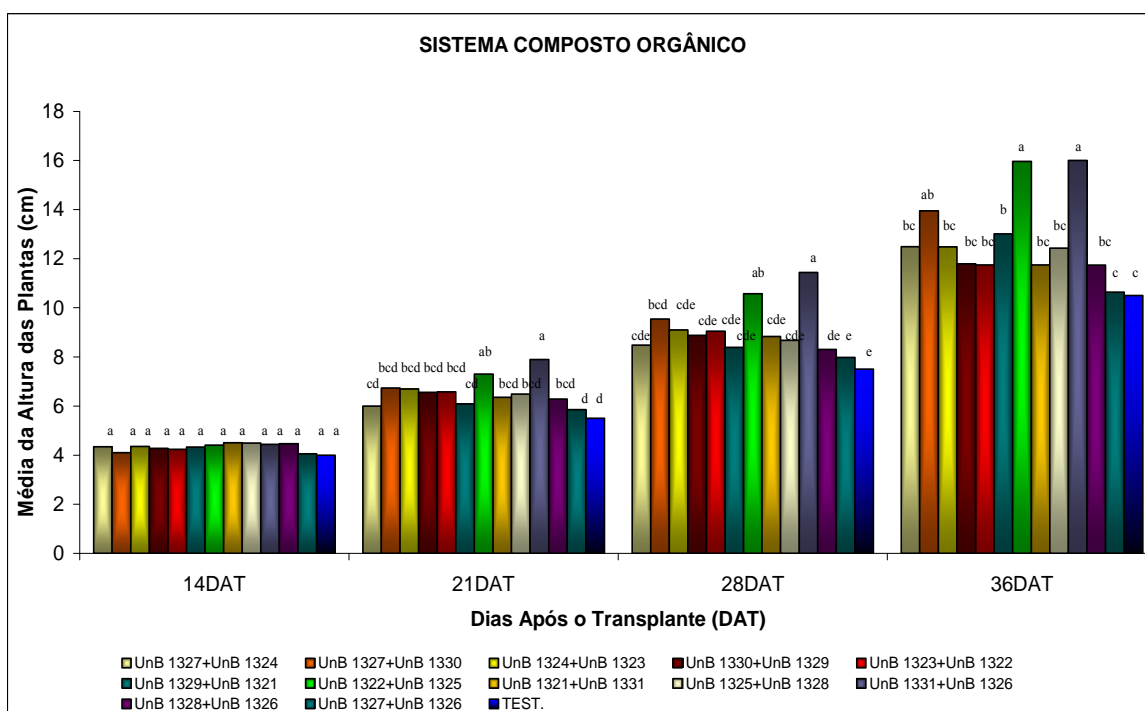
Tratamentos	Média da altura das plantas de tomate (cm)	
	Composto Orgânico	Bokashi
UnB 1327	38,87 a*	33,72 a
UnB 1324	37,63 a	29,57 b
UnB 1330	31,46 b	23,90 c
UnB 1329	30,74 b	26,07 c
UnB 1323	29,95 b	22,22 c
UnB 1322	25,93 c	23,92 c
UnB 1321	23,68 c	29,23 b
UnB 1325	23,65 c	14,59 d
UnB 1331	22,94 c	15,36 d
UnB 1328	21,40 c	27,23 b
UnB 1326	14,48 d	27,20 b
Test.	11,64 d	16,17 d

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Neste segundo experimento, com base nos resultados da Tabela 2.2, verificou-se que ambos os sistemas orgânicos a combinação de dois isolados não foi eficiente na promoção do crescimento das plantas de tomate, em casa de vegetação, quando comparados a testemunha.

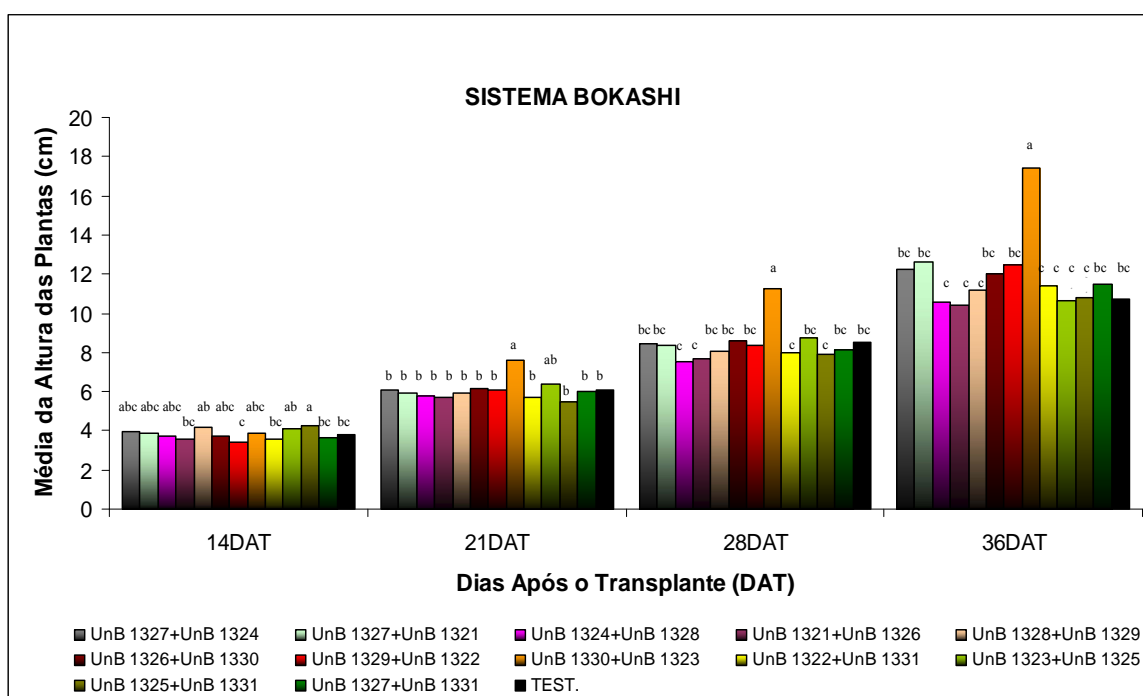
No sistema CO, na primeira avaliação que ocorreu aos 14 DAT, não houve diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos, aos 21 DAT somente a

combinação dos isolado UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) apresentou maior média diferindo significativamente da combinação UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) apresentando menor crescimento. Aos 36 DAT a combinação dos isolados UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1325 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) apresentaram maiores médias na altura das plantas, ambas com 16,0 cm, comparadas a testemunha, a combinação UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) apresentou menor média na altura das plantas com crescimento 10,6 cm. (Figura 2.3).



**Figura 2.3-** Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 2, com avaliação semanal, no sistema Composto Orgânico. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

Já no sistema Bokashi, na primeira avaliação aos 14 DAT somente a combinação UnB 1325 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) diferiu significativamente da combinação UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.), as testemunhas foram semelhantes aos demais tratamentos. Aos 21 DAT a combinação UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) foi significativamente semelhante à combinação UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1325 (*Klebsiella* sp.) e esta última não diferindo dos demais tratamentos. Nas duas últimas semanas de avaliações observou-se que a combinação UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) destacou-se de todos os tratamentos apresentando aos 36 DAT uma média na altura das plantas de 17,4 cm em relação à testemunha com menor média 10,7 cm embora não diferisse significativamente dos demais tratamentos. (Figura 2.4).

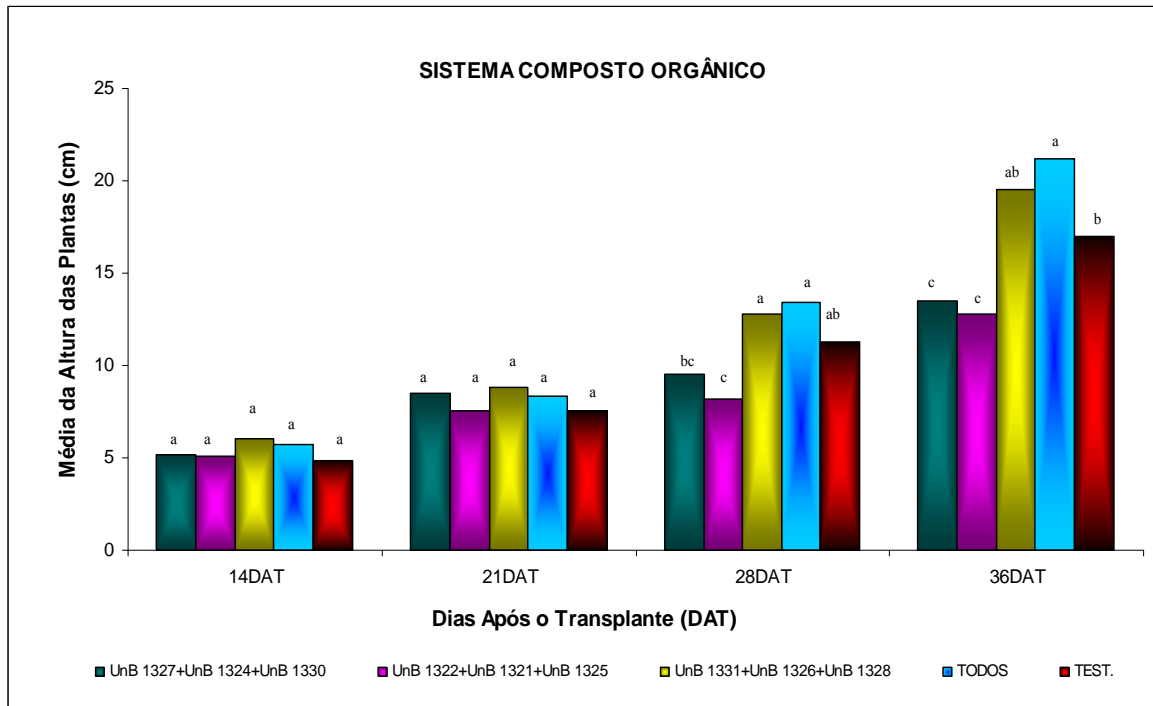


**Figura 2.4** - Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 2, com avaliação semanal, no sistema Bokashi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.)



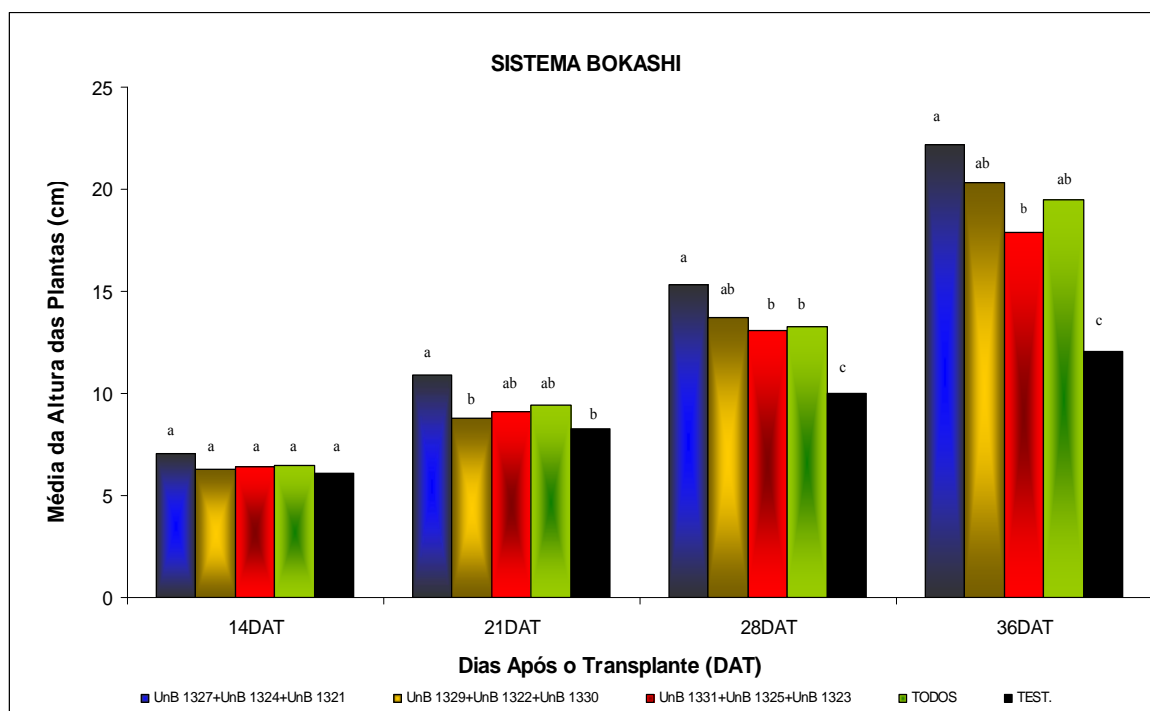
### **3.3 - Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos os isolados bacterianos na altura das plantas de tomate.**

No sistema CO, embora não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos nas duas primeiras semanas de avaliações, observou-se que mostrou resultados melhores na última semana de avaliação, comparada ao sistema BK. Nesse sistema aos 28 DAT a combinação dos isolados UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.) e TODOS apresentaram diferenças significativas da combinação UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1325 (*Klebsiella* sp.), sendo este semelhante a combinação UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.). Aos 36 DAT estas mesmas combinações de isolados que estavam mostrando maiores médias na altura das plantas, se destacaram nesta semana apresentando uma média de 19,5 cm e 21,2 cm, respectivamente, comparada à testemunha com uma média de 17,0 cm (Figura 2.5).



**Figura 2.5** - Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 3 e TODOS, com avaliação semanal, no sistema Composto Orgânico. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

No sistema Bokashi, aos 14 DAT não houve diferenças significativas entre os tratamentos, no entanto aos 28 DAT e até o final da avaliação a combinação de UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) foi significativamente diferente da testemunha. Aos 36 DAT esse tratamento apresentou maior média com 22,2 cm enquanto o tratamento com menor média obteve valor de 12,0 cm. Embora apresentando maior média na altura das plantas, este tratamento não diferiu dos demais, com exceção da combinação UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1325 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) (Figura 2.7).



**Figura 2.6-** Efeito dos isolados bacterianos procedentes de condições extremas, na altura das plantas de tomate, experimento combinado de 3 e todos, com avaliação semanal, no sistema Bokashi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de t ( $p \leq 5\%$ ). Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergiera* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

### 3.4- Determinações da matéria fresca e seca das plantas de tomate

O efeito dos isolados extremófilos na promoção de crescimento variou em função das variáveis avaliadas, como já foi mostrado na altura das plantas e agora na matéria fresca e seca. No experimento individual, no sistema CO 90,9% dos isolados apresentaram aumento do peso da matéria fresca (PMF) em relação à testemunha; enquanto que no sistema BK 100% dos isolados apresentaram este aumento. No sistema CO, de maneira geral, os maiores incrementos do PMF foram proporcionados pelos isolados UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) e UnB 1327 (*Klebsiella* sp.), cujos aumentos foram de 86,9% e 55,9%, respectivamente, maiores do que a testemunha (100%). No entanto, verificando o peso da matéria seca (PMS) somente o isolado UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) diferiu significativamente de todos os tratamentos, mostrando um incremento de 106,1% em relação ao mesmo padrão avaliado no PMF (Tabela 2.3). Já nos experimentos em

combinação estes aumentos não foram tão significantes quando comparados ao experimento individual.

No experimento em combinação de dois, neste mesmo sistema, somente três combinações de isolados UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.), UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1325 (*Klebsiella* sp.) mostraram maiores incrementos no PMF cujos aumentos foram 33,1%, 30,7% e 14,4% e para o PMS 32,2%, 38,9% e 15,3%, respectivamente, em relação à testemunha (100%), embora apresentassem estes aumentos não difeririu da testemunha, com exceção da combinação UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.). No experimento em combinação de três e TODOS, a combinação dos isolados UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.) e a combinação de TODOS isolados mostraram maiores incrementos no PMF e PMS, em relação ao padrão avaliado que foi à testemunha (Tabela 2.3).

Já no sistema BK, tanto no experimento individual quanto no experimento em combinação de três e TODOS, 100% dos tratamentos apresentaram maiores incrementos em relação ao padrão. No experimento individual os isolados UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) e UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) não diferiram estatisticamente mostrando maiores incrementos no PMF com 140,2% e 102,3%, respectivamente em relação ao padrão (Tabela 2.4). No experimento combinado de dois somente a combinação UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) apresentou aumento no PMF e PMS, os demais tratamentos mostraram redução em relação ao padrão avaliado. No experimento em combinação de três e com TODOS isolados inoculados simultaneamente, embora não diferissem da testemunha, com exceção da combinação UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) mostraram maiores incrementos em relação à testemunha, principalmente para as combinações UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e TODOS para o PMF com 83,7% e 54,6% e para o PMS com 83,0% e 58,5% em relação ao padrão avaliado (Tabela 2.4).

**Tabela 2.3-** Efeito dos isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de tomateiro, sobre o peso da matéria fresca e seca, nos três tipos de experimentos, avaliados aos 28 e 36 DAT, no sistema Composto Orgânico.

Tratamentos	Individual				Combinado de 2				Combinado de 3 e Todos			
	PMF <sup>2</sup>		PMS <sup>3</sup>		PMF		PMS		PMF		PMS	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
UnB 1324	5,72 a <sup>1</sup>	+ <sup>4</sup> 186,93	0,68 a	+206,06	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1327	4,77 ab	+155,88	0,41 bc	+124,24	-	-	-	-	-	-	-	-
UNB 1330	3,81 bc	+124,51	0,49 b	+148,48	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1329	3,73 bc	+121,89	0,47 b	+142,42	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1328	3,54 bc	+115,69	0,41 bc	+124,24	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1325	3,34 c	+109,15	0,39 bc	+118,18	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1321	3,30 c	+107,84	0,41 bc	+124,24	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1331	3,29 c	+107,52	0,38 bc	+115,15	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1322	3,28 c	+107,19	0,38 bc	+115,15	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1323	3,08 c	+100,65	0,36 bc	+109,09	-	-	-	-	-	-	-	-
Test.	3,06 c	100,00	0,33 c	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1326	3,01 c	- <sup>5</sup> 98,37	0,37 bc	+112,12	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1321+UnB 1331	-	-	-	-	6,03 a	+133,11	0,78 ab	+132,20	-	-	-	-
UnB 1331+UnB 1326	-	-	-	-	5,92 a	+130,68	0,82 a	+138,98	-	-	-	-
UnB 1322+UnB 1325	-	-	-	-	5,18 ab	+114,35	0,68 abc	+115,25	-	-	-	-
Test.	-	-	-	-	4,53 abc	100,00	0,59 bcde	100,00	-	-	-	-
UnB 1327+UnB 1330	-	-	-	-	4,49 abc	-99,12	0,56 bcde	-94,92	-	-	-	-
UnB 1325+UnB 1328	-	-	-	-	3,89 bcd	-85,87	0,50 cde	-84,75	-	-	-	-
UnB 1324+UnB 1323	-	-	-	-	3,83 bcd	-84,55	0,52 cde	-88,14	-	-	-	-
UnB 1327+UnB 1324	-	-	-	-	3,53 bcd	-77,92	0,48 cde	-81,36	-	-	-	-
UnB 1323+UnB 1322	-	-	-	-	3,45 cd	-76,16	0,48 cde	-81,34	-	-	-	-
UnB 1329+UnB 1321	-	-	-	-	3,27 cd	-72,18	0,43 de	-72,88	-	-	-	-
UnB 1328+UnB 1326	-	-	-	-	3,27 cd	-72,18	0,44 de	-74,58	-	-	-	-
UnB 1330+UnB 1329	-	-	-	-	3,25 cd	-71,74	0,48 cde	-81,34	-	-	-	-
UnB 1327+UnB 1326	-	-	-	-	2,75 d	-60,71	0,41 e	-69,49	-	-	-	-
UnB 1331+UnB 1326+UnB 1328	-	-	-	-	-	-	-	-	6,53 a	+118,81	0,83 a	+140,68
TODOS	-	-	-	-	-	-	-	-	6,34 ab	+108,56	0,82 a	+138,98
Test.	-	-	-	-	-	-	-	-	5,84 ab	100,00	0,78 ab	100,00
UnB 1322+UnB 1321+UnB 1325	-	-	-	-	-	-	-	-	4,52 bc	-77,40	0,57 bc	-73,08
UnB 1327+UnB 1324+UnB 1330	-	-	-	-	-	-	-	-	4,36 bc	-74,66	0,59 abc	-75,64
CV(%)	23,14		23,88		23,97		22,22		19,41		20,23	

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t

<sup>2</sup> Peso da matéria fresca, <sup>3</sup> peso da matéria seca

<sup>4</sup> Aumento (em percentagem) em relação à Test.

<sup>5</sup> Redução (em percentagem) em relação à Test.

Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergiera* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

**Tabela 2.4-** Efeito dos isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de tomateiro, sobre o peso da matéria fresca e seca, nos três tipos de experimentos, avaliados aos 28 e 36 DAT, no sistema Bokashi.

Tratamentos	Individual				Combinado de 2				Combinado de 3 e todos			
	PMF <sup>2</sup>		PMS <sup>3</sup>		PMF		PMS		PMF		PMS	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
UnB 1324	6,27 a <sup>1</sup>	+240,23	0,72 a	+205,71	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1327	5,28 ab	+202,30	0,54 abc	+154,29	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1330	4,87 bc	+186,60	0,58 ab	+165,71	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1329	4,48 bcd	+171,65	0,56 ab	+160,00	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1321	3,85 cde	+147,51	0,51 bcd	+145,71	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1325	3,69 cde	+141,38	0,38 cd	+108,57	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1328	3,65 cde	+139,85	0,44 bcd	+125,71	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1322	3,54 cde	+135,63	0,40 bcd	+114,29	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1331	3,41 de	+130,65	0,37 cd	+105,71	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1323	3,01 e	+115,33	0,31 d	- <sup>5</sup> 88,57	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1326	2,92 e	+111,88	0,33 d	-94,28	-	-	-	-	-	-	-	-
Test.	2,61 e	100,00	0,35 cd	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-
UnB 1330+UnB 1323	-	-	-	-	5,67 a	+112,50	0,87 a	+120,83	-	-	-	-
Test.	-	-	-	-	5,04 ab	100,00	0,72 ab	100,00	-	-	-	-
UnB 1329+UnB 1322	-	-	-	-	3,95 bc	-78,37	0,56 bc	-77,78	-	-	-	-
UnB 1327+UnB 1321	-	-	-	-	3,62 bcd	-71,83	0,50 cd	-69,44	-	-	-	-
UnB 1327+UnB 1331	-	-	-	-	3,47 bcd	-68,85	0,50 cd	-69,44	-	-	-	-
UnB 1323+UnB 1325	-	-	-	-	3,35 cd	-66,47	0,51 cd	-70,83	-	-	-	-
UnB 1326+UnB 1330	-	-	-	-	3,24 cd	-64,29	0,47 cd	-65,28	-	-	-	-
UnB 1327+UnB 1324	-	-	-	-	3,20 cd	-63,49	0,47 cd	-65,28	-	-	-	-
UnB 1328+UnB 1329	-	-	-	-	2,99 cd	-59,32	0,44 cd	-61,11	-	-	-	-
UnB 1322+UnB 1331	-	-	-	-	2,97 cd	-58,93	0,44 cd	-61,11	-	-	-	-
UnB 1321+UnB 1326	-	-	-	-	2,70 cd	-53,57	0,40 cd	-55,56	-	-	-	-
UnB 1325+UnB 1331	-	-	-	-	2,64 cd	-52,38	0,39 cd	-54,17	-	-	-	-
UnB 1324+UnB 1328	-	-	-	-	2,38 d	-47,22	0,34 d	-47,22	-	-	-	-
UnB 1329+UnB 1322+UnB 1330	-	-	-	-	-	-	-	-	7,33 a	+183,71	0,97 a	+183,02
TODOS	-	-	-	-	-	-	-	-	6,17 ab	+154,64	0,84 ab	+158,49
UnB 1331+UnB 1325+UnB 1323	-	-	-	-	-	-	-	-	5,36 ab	+134,34	0,74 ab	+139,62
UnB 1327+UnB 1324+UnB 1321	-	-	-	-	-	-	-	-	5,36 ab	+134,34	0,71 ab	+133,96
Test.	-	-	-	-	-	-	-	-	3,99 b	100,00	0,53 b	100,00
CV(%)	26,96		27,70		24,99		22,51		18,96		20,34	

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t

<sup>2</sup> Peso da matéria fresca, <sup>3</sup> peso da matéria seca

<sup>4</sup> Aumento (em percentagem) em relação à Test.

<sup>5</sup> Redução (em percentagem) em relação à Test.

Os isolados pertencem aos seguintes gêneros: UnB 1321, 1322, 1323 e 1324 (*Enterobacter* sp.), UnB 1325, 1326 e 1327 (*Klebsiella* sp.), UnB 1328 e 1329 (*Pseudomonas* sp.), UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.).

### **3.5 - Bioensaio de solubilização de fosfatos com os isolados bacterianos providos de condições extremas**

Neste ensaio nenhum dos trinta e oito isolados estudados foram capazes de formar um halo transparente ao redor da colônia, em contraste com meio opaco, podendo não ser isolados solubilizadores de fosfatos, por este motivo não foi apresentado nenhum resultado deste trabalho.

## **4- DISCUSSÃO**

Os resultados do presente trabalho mostraram o efeito benéfico da aplicação dos isolados sobre o crescimento das plantas de tomate, em casa de vegetação. Em todos os experimentos realizados observaram-se plantas destacando-se na altura, em relação a outras. O experimento 1 com aplicação individual, mostrou que os isolados incorporaram melhor ao solo, com altura das plantas (ALT), peso da matéria fresca (PMF) e peso da matéria seca (PMS) se destacando, em relação a testemunha que não foi inoculada com os isolados.

Na avaliação da altura das plantas foi levado em conta não somente o tipo de aplicação dos isolados, individual ou em misturas, mas também os diferentes materiais orgânicos aplicados e as condições ambientais de cada estudo. No caso do experimento individual, verificou-se que no sistema CO, a testemunha apresentou média da altura das plantas menor aos tratamentos com maiores médias. É o caso do isolado UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) que apresentou maiores incrementos para ALT, PMF e PMS de 235,3%, 55,9% e 24,2%, respectivamente, maiores que a testemunha (100%). Essas diferenças da ALT em relação ao PMF e PMS pode ter ocorrido em decorrência da coleta aleatória de 5 plantas/ bandeja, sobrando as plantas maiores.

Este dado corrobora os encontrados por Barreti et al. (2008) que estudando diferentes isolados de bactérias endofíticas, aplicados separadamente, em plantas de tomateiro, verificaram-se que o isolado UFV-E49 apresentou melhor resultado para altura, área foliar, número de folhas e peso da matéria fresca e seca, em relação à testemunha. Resultados semelhantes foram realizados por Barreti (2001) em plantas de

tomate tratadas com os isolados UFV-E13 mostrou crescimento maior em relação às plantas não tratadas com a bactéria endofítica. Silva (2004) observou que altura das plantas de tomateiro foi afetada pela introdução de algumas bactérias endofíticas, sendo que *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus pumilus* promoveram a maior altura das plantas em 9,5% e 20,2%, respectivamente.

No experimento individual verificou-se que os isolados UnB 1325, UnB 1326 e UnB 1327 pertencentes ao gênero *Klebsiella* spp. apresentaram comportamentos muito diversificados, em ambos sistemas orgânicos, provavelmente por serem de espécies diferentes; ou até mesmo por serem originados de solos onde estavam cultivados materiais distintos, como milho, pimentão e crotalária, respectivamente (como visto no capítulo 1). Isolados de um hospedeiro podem facilmente colonizar hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade (Quadat-Halman & Kloepper, 1996), promovendo o crescimento das plantas (Melo et al. 2002).

No experimento 2, em combinação com dois isolados observou-se que em ambos os sistemas orgânicos, a maioria dos isolados não diferiu da testemunha, mostrando que a mistura de dois isolados, no presente estudo não foi eficiente quanto no experimento individual. Isto pode ser explicado pelo fato que na inoculação individual não há competição entre os isolados, fazendo com que aqueles mais promissores se destaquem, enquanto que na mistura de isolados ocorre à competição por nichos ecológicos e por nutrientes. No entanto, algumas combinações de isolados mostraram efeitos significativos para os parâmetros ALT, PMF e PMS. Fato demonstrado no sistema BK, com a combinação dos isolados UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) que apresentaram um incremento de 62,6%, 12,5% e 20,8%, respectivamente, maior em relação à testemunha (100%).

Trabalhos envolvendo a mistura de isolados na promoção do crescimento foram observados em outras culturas, por vários autores. Weber et al. (2000) estudando bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras, em casa de vegetação, verificaram-se que as plantas apresentaram maior crescimento quando foram inoculadas simultaneamente com dois gêneros de bactérias *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp. em comparação à inoculação individual. No entanto, Mafia et al. (2007) estudando a compatibilidade de diferentes isolados de rizobactérias no enraizamento e crescimento de clones de eucaliptos, não se observaram sinergia entre misturas de isolados compatíveis, assim como também não ocorreu redução na eficiência da mistura de isolados incompatíveis.



No presente estudo observou-se que alguns isolados aplicados individualmente mostrando comportamentos mais promissores, quando foram combinados com outros isolados do mesmo gênero ou pertencente à mesma família, apresentaram altura das plantas inferiores ao tratamento mais significativo; como exemplo os mostrados no sistema BK e CO que foi a combinação UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1324 (*Enterobacter* sp.), ambos isolados pertencentes à família Enterobacteriaceae. Entretanto, outras combinações de isolados de gênero ou famílias diferentes podem, mas não necessariamente, apresentar efeitos contrários, como é o caso da combinação UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.), no sistema BK, ambos isolados pertencentes às famílias Enterobacteriaceae e Comamonadaceae, respectivamente. De acordo com Mafia et al. (2007) é possível que, após a aplicação, o isolado que apresenta maior capacidade competitiva se estabeleça na rizosfera, em detrimento do outro utilizado na mistura.

Existem alguns mecanismos de antagonismo que os microrganismos podem acionar para sobreviver em microbiotas complexas e constituídas de múltiplas espécies microbianas, são eles: competição por nutrientes e por nichos ecológicos, sequestro de íons ferro, a produção de substâncias antimicrobianas, como antibióticos e compostos voláteis e outros. A competição por nutrientes é uma das formas mais básicas de antagonismo. Segundo Duffy et al. (2003), a população bacteriana aumenta em função da disponibilidade de nutrientes no ambiente, e organismos que se multiplicam rapidamente são capazes de utilizar uma gama de nutrientes mais ampla e têm mais chance de sobreviver e suplantam os competidores. Para Weller (1988) organismos fisiologicamente versáteis, como as espécies do gênero *Pseudomonas* são melhores competidores.

A produção de substâncias antimicrobianas como as fenazinas com propriedades antifúngicas e antibacterianas tem sido encontradas em várias bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Burkholderia* etc. (Chin-woeng et al., 2003). Outros compostos antimicrobianos são as bacteriocinas ou também conhecidos como antibióticos (Madigan et al., 2003) são substâncias produzidas por bactérias e capazes, em baixas concentrações de inibir a multiplicação de outras bactérias taxonomicamente afins. As bacteriocinas reconhecem os sítios receptores de células de estirpes sensíveis e então ganha o interior da célula via processos ainda não esclarecidos e, dependendo da interação microbiana, vários mecanismos de ação podem

atuar, isolada ou concomitantemente, ocasionando a morte de células sensíveis (Romeiro, 2007).

A produção de compostos antimicrobianos voláteis pode inibir o crescimento ou a multiplicação de outros microrganismos (Madigan et al., 2003). De acordo com Duffy et al. (2003) essas substâncias produzidas por bactérias podem ser álcoois, aldeídos, cetonas, sulfetos etc. Fravel (1988) relata que a amônia, sintetizada e liberada por *Enterobacter cloacae*, tem ação inibitória sobre *Verticillium dahliae* e *Pythium ultimum*.

Outro processo que pode estar envolvido na interação entre um microrganismo e outro é a produção de sideróforos. O ferro é um elemento importante na nutrição de plantas e de microrganismos. Apesar de ser encontrado em abundância na natureza, parece não existir na forma prontamente disponível e assimilável, ou seja, é abundante, mas pouco disponível. Adicionalmente, um microrganismo que for capaz de sequestrar esse ferro, indisponibilizando-o para outros integrantes da microbiota, leva uma grande vantagem competitiva (Fravel, 1988; Whipps, 2001; Lim et al., 2002; Duffy et al., 2003). Sideróforos são, em verdade, eficientes quelantes ou sequestradores de ferro (Neilands, 1995). *Rhizobium meliloti*, simbiote para várias leguminosas proporciona crescimento por mecanismos diversos, inclusive pela fixação de nitrogênio. Arora et al. (2001) encontraram dois isolamentos RMP3 e RMP5, que além de promoverem crescimento em amendoim, eram produtores de sideróforos e promoviam o biocontrole da podridão incitada por *Macrophomina phaseolina*.

No experimento 3, na combinação de três e com todos isolados simultaneamente, verificou-se que a mistura de três isolados, como no sistema BK na combinação UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Giesbergiera* sp., respectivamente, promoveram crescimento das plantas, quando analisados os parâmetros ALT, PMF e PMS, com incrementos de 67,7%, 83,7% e 83,0%, respectivamente em relação à testemunha. Em ambos os sistemas orgânicos observou-se que a mistura de três ou mais isolados simultaneamente, embora diferenciasse da testemunha, com exceção do tratamento UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.), no sistema CO, não foram eficientes na promoção do crescimento das plantas de tomate, apresentando valores na média da altura das plantas inferiores a aplicação individual, provavelmente porque nestas misturas de isolados não devem ter ocorrido a competição entre os isolados, ou pode ser explicado pelas condições ambientais do local não terem favorecido o crescimento das plantas.

Weber et al. (2000) onde estudando a mistura de dois e quatro isolados de *Herbaspirillum* e *B. cepacia*, verificaram que a combinação de dois foi mais eficiente na promoção do crescimento das mudas de bananeiras, não diferindo do tratamento com mistura de quatro isolados, indicando que não houve competição entre os isolados dos dois gêneros de bactérias. Harthmann et al. (2010) em seu trabalho com misturas de rizobactérias no crescimento e produtividade em cebolas, observaram-se que tanto a aplicação individual quanto a mistura de três isolados W6 (*Pseudomonas* spp.), W19 (*B. megaterium*) e UFV40 (*B. cereus*), apresentaram valores superiores a testemunha não tratada, em relação à produção total de bulbos. Segundo Schisler et al. (1997) é importante considerar que, em certas situações, a mistura de diferentes isolados pode não resultar em efeito sinérgico. Além do mais, esse efeito pode não ocorrer com a mudança das condições ambientes e, ou, com a troca do material vegetal de interesse.

Nas condições de ensaios realizados *in vitro*, verificou-se que nenhum dos isolados estudados solubilizaram fosfato, sugerindo que este mecanismo não foi responsável pela promoção do crescimento. Estudos posteriores com experimentos moleculares como, transcriptoma- que se refere ao conjunto completo de transcritos (RNAs) de um dado organismo, reflexo direto da expressão gênica e a proteoma que se refere ao conjunto de proteínas expressas por um genoma, deverão ser realizados com outros mecanismos de crescimento, para melhor compreender a interação de benefícios dessas bactérias no desenvolvimento das plantas de tomate. No entanto, no presente trabalho foi possível verificar modificações no crescimento da parte aérea, aumentos no peso da matéria fresca e seca. Segundo Patten & Glick (1996) caso pelo menos uma dessas modificações for observada a bactéria pode ser considerada como promotora de crescimento vegetal.

## **5- CONCLUSÕES**

No experimento com aplicação individual, em ambos os sistemas orgânicos, os isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) mostraram ser eficientes agentes no estudo da promoção do crescimento das plantas de tomate, avaliados em casa de vegetação. Ambos os isolados se destacaram com maiores incrementos na altura das plantas, peso da matéria fresca e seca, em relação à testemunha (não tratada).

Os experimentos em combinações de isolados mostraram que não tiveram efeitos significativos na altura, peso da matéria fresca e seca, em ambos os sistemas orgânicos, quando comparados com a aplicação individual que demonstrou melhores resultados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Adesemoye AO, Obini M, Ugogi EO (2008) Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:423-426.

Alam S, Cui ZJ, Yamagishi T, Ishii R (2001) Grain yield and related physiological characteristics of Rice plants (*Oryza sativa* L.) inoculated with free-living rhizobacteria. **Plant Production Science** 4:126-130.

Arora NK, Kang SC, Maheshwari DK (2001) Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Current Science Bangalore** 81:673-677.

Barreti PB (2001) Isolamento e seleção de bactérias endofíticas com potencialidade para o biocontrole de enfermidades do tomateiro. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG.

Barreti PB, Souza RM, Pozza EA (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia** 32:731-739.

Carvalho JL, Pagliuca LG (2007) Tomate, um mercado que não pára de crescer globalmente. **Hortifruti** 58:6-14.

Cattelan AJ (1999) Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina PR. **Embrapa Soja. Documento 139**.

Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist** 157:503-523.

Dashti N, Zhang F, Hynes R, Smith DL (1997) Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. **Plant and Soil** 188:33-41.

Duffy B, Schouten A, Raaijmakers JM (2003) Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review Phytopathology** 41:501-538.

Fravel DR (1988) Role in antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology** 26:75-91.

Freitas SS, Vildoso CIA (2004) Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 28:987-994.

Fommel MI, Nowak J, Lazarovits G (1991) Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* growth potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology** 96:928-936.

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahafee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** 43:895-914.

Harthmann OEL, Mógor AF, Wordell Filho JA, Luz WC (2010) Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural** 40:462-465.

Jakobsen TF, Kjeldsen KU, Ingvorsen K (2006) *Desulfohalobium utahense* sp. nov., a moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Great Salt Lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56:2063-2069.

Joshi AA, Kanekar PP, Kelkar AS, Shouche YS, Vani AA, Borgave SB, Sarnaik SS (2008) Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India. **Microbial Ecology** 55:163-172.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969-976.

Kang SC, Ha CG, Leet TG, Maheshwari DK (2002) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Current Science** 82:439-442.

Lim HS, Lee JM, Kim SD (2002) A plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20: Mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol efficacy. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 12:249-257.

Lucon CMM, Akamatsu MA, Harakava R (2008) Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43:691-697.

Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 86:1-25.

Madigan MMJ, Martinko MJE (2003) **Brock biology of microorganisms**. New York: Prentice Hall, 1104p.

Mafia RG, Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Siqueira L (2007) Compatibilidade e efeito da mistura de isolados de rizobactérias na indução do enraizamento e crescimento de clones de eucalipto. **Revista Árvore** 31:635-643.

Mano H, Morisaki H (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes and Environments** 23:109-117.

Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA, Nascimento ARP, Donato VMTS (2004) Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife 1:89-111.

Mariano RLR, Silveira EB (2005) Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano RLR, Silveira EB (Ed.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. p. 47-50.

Mello MRF, Mariano RLR, Menezes M, Câmara TR, Assis SMP (2002) Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica** 28:222-228.

Mendonça HL (2006) Seleção de rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de resistência sistêmica em feijoeiro. **Tese** (Magister Scientiae). Universidade Federal de Viçosa, UFV. Viçosa MG.

Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA (2006) Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. **Extremophiles** 10:85-96.

Mirza MS, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P, Malik KA (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil** 237:47-54.

Musson G, Mcinroy JÁ, Kloepper JW (1995) Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology** 5:407-416.

Neilands JB (1995) Siderophores: Structure and functions of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry** 270:26723-26726.

Nejad P, Johnson PA (2000) Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. **Biological Control** 18:208-215.

Pandey A, Sharma E, Palni LMS (1998) Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. **Soil Biology & Biochemistry** 30:379-384.

Patten C, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology** 42:207-220.

Pereira RM, Silveira EL, Carareto-Alves LM, Lemos EGM (2008) Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 32:1921-1927.

Pillay VK, Nowak J (1997) Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology** 43:354-361.

Quadt-Hallmann A, Kloepper JW (1996) Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant diseases. **Canadian Journal of Microbiology** 42:1144-1154.

Ramírez ND, Serrano JAR, Sandoval HT (2006) Microorganismos Extremófilos. Actinomicetos Halófilos en México. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas** 37:56-71.

Romeiro RS (2007) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**: fundamentos. Viçosa MG. UFV.

Santos MHLC, Mariano RLR, Camara TR, Andrade AG, Willadino L, Lima GPP (2005) Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. *Hoehnea* 32:1-8.



Saubidet MI, Fatta N, Barneix AJ (2002) The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil** 245:215-222.

Schisler DA, Slininger PJ, Bothast RJ (1997) Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. **Phytopathology** 87:177-183.

Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP, Zillig W (1995) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, Thermoacidophilic Genus and Family comprising Archaea capable of growth around pH 0. **Journal of Bacteriology** 177:7050-7059.

Shi Y, Lou K, Li C (2009) Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. **Biology and Fertility of Soils** 45:645-653.

Silva JRC (2004) Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta bacteriana do tomateiro. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Silva FAS (2009) Versão 7.5 do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. [http:// www.assistat.com](http://www.assistat.com). Acesso em 16/10/2009

Silveira EB (2001) Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: Michereff SJ, Barros R (Eds.) **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**- Recife: UFRPE. pp. 78-107.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** 255:571-586.

Watanabe K, Nagao N, Yamamoto S, Toda T, Kurosawa N (2007) *Thermobacillus composti* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a composting reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57:1473-1477.

Weber OB, Baldani JJ, Döbereiner J (2000) Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35:2277-2285.

Weller DM (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review Phytopathology** 26:379-407.

Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 52:487-511.

### **BACTÉRIAS EXTREMÓFILAS FACULTATIVAS: EFEITO NA SUPRESSÃO DE *Ralstonia solanacearum*, EM PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

#### **RESUMO**

Experimentos *in vitro* e *in vivo*, sobre condições controladas, foram realizados para avaliar o comportamento dos isolados de bactérias extremófilas facultativas, na supressão de *R. solanacearum*. Foram realizados três experimentos, sendo que em cada um deles, com dois sistemas orgânicos: Composto Orgânico (CO) e Bokashi (BK), com delineamento inteiramente casualizado. A quantidade de tratamentos variou conforme o tipo de experimento, mas mantendo em todos 1 testemunha e 3 repetições. Assim, no experimento 1, com aplicação individual, 11 tratamentos (isolados), no experimento 2 (combinação de dois isolados) com 12 tratamentos e no experimento 3 (combinação de três e com todos simultaneamente) com 4 tratamentos. A inoculação dos isolados foi antes do transplante utilizando 100 mL de suspensão/bandeja (para os experim. 1 e 2) e 150 mL (experim. 3) na concentração de  $6 \times 10^8$  UFC/mL. Para a inoculação de *R. solanacearum* foi aplicado uma suspensão de 100 mL/ bandeja, na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/ mL. A avaliação foi feita medindo altura das plantas aos 21 DAI e a contagem do número de plantas mortas aos 7, 14, 21 e 28 DAI. No presente trabalho, dos trinta e oito isolados estudados no teste de antibiose, nove apresentaram efeito inibitório direto *in vitro* a *R. solanacearum*. No experimento 1, os isolados UnB 1321 no sistema BK e UnB 1326 e UnB 1322 no sistema CO, mostraram ser eficientes na supressão da bacteriose, destacando-se com 100% de controle. O experimento 2, mostrou ser mais eficiente na supressão da murcha bacteriana, independentemente do tipo de sistemas avaliados. No experimento 3, no sistema BK, a testemunha diferenciou significativamente de todos os tratamentos, inclusive da combinação UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 apresentando 87% e 27%, respectivamente, de plantas mortas. No sistema CO, houve alta percentagem da doença em todos os tratamentos, no entanto nenhum tratamento diferenciou da testemunha que apresentou 60% de plantas mortas.

**Palavras-chave:** bactérias termófilas, bactérias alcalófilas, bactérias acidófilas, bactérias halófilas, murcha bacteriana, controle biológico.

### **FACULTATIVE EXTREMOPHILE BACTERIA: EFFECT ON SUPPRESSION OF *Ralstonia solanacearum* IN TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.)**

#### **ABSTRACT**

Experiments *in vitro* and *in vivo*, under controlled conditions, were carried out to evaluate the behavior of isolates of facultative extremophile bacteria in the suppression of *R. solanacearum*. Three experiments were performed, each one involving two organic systems: Organic Compost (CO) and Bokashi (BK), in an entirely randomized design. The number of treatments varied depending on the type of experiment, but all used 1 control (untreated) and 3 repetitions. There were, therefore, in experiment 1, with individual application, 11 treatments (isolates); in experiment 2 (combination of two isolates) 12 treatments; and in experiment 3 (combination of three and with all simultaneously) 4 treatments. Inoculation of the isolates took place before transplant using 100 mL of suspension/tray (for experiments 1 and 2) and 150 mL (experiment 3) at a concentration of  $6 \times 10^8$  UFC/mL. For inoculation of *R. solanacearum* a suspension of 100 mL/tray was applied at the concentration of  $1 \times 10^9$  UFC/ mL. The evaluation was carried out by measuring plant height at 21 DAI and counting the number of dead plants at 7, 14, 21 and 28 DAI. In this study, of the 38 isolates studied in the antibiosis test, nine presented a direct inhibitory effect *in vitro* on *R. solanacearum*. In experiment 1, isolates UnB 1321 in the BK system and UnB 1326 and UnB 1322 in the CO system were seen to be efficient in the suppression of bacteriosis, at 100% difference from the control. Experiment 2 was efficient in suppressing bacterial wilt, independently of the type of system being evaluated. In experiment 3, in the BK system, the control was significantly different from all the treatments, including from the UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 combination, presenting 87% and 27% dead plants, respectively. In the CO system, there was a high percentage of the disease in all treatments, but no treatment differed from the control, which presented 60% dead plants.

**Key words:** thermophilic bacteria, alkalophilic bacteria, acidophilic bacteria, halophilic bacteria, bacterial wilt, biological control.

## 1-INTRODUÇÃO

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. Yabuuchi et al. (1995) é considerada uma das mais importantes e prejudiciais doenças do tomateiro e de outras solanáceas, principalmente em cultivos onde predominam baixa altitude e altas temperaturas e umidades (Lopes & Santos, 1994; Vale et al., 2004). No Brasil, as culturas mais afetadas, são as solanáceas, como tomate, batata, pimentão, berinjela e jiló, também incluindo a bananeira (Bringel et al., 2001), eucalipto (Sudo et al., 1983; Dianese & Takatsu, 1985; Robbs et al., 1988; Alfenas et al., 2006) e agora casos mais recentes já foram constatada em helicônias e musácea ornamental (Zoccoli et al., 2009).

O primeiro sintoma da murcha bacteriana em tomateiro é a murcha dos folíolos na parte superior das plantas, podendo durante a noite ou nas horas mais frias do dia recuperar a turgidez. Assim quando as condições são favoráveis ao desenvolvimento da doença, a murcha atinge toda a planta, tornando irreversível. No entanto, quando as condições não são favoráveis às plantas, estas já infectadas pela bactéria podem apresentar um crescimento retardado, amarelecimento e epinastia das folhas e a formação aéreas na base do caule (Lopes & Santos, 1994; Lopes & Quezado-Soares, 2000).

*Ralstonia solanacearum* é um patógeno que sobrevive no solo por vários anos, associados a restos de cultura e á rizosfera de muitas plantas, tornando-se difícil a sua erradicação numa área (Lopes & Quezado-Soares, 2000). O controle biológico pela introdução de microrganismos antagonistas parece ser uma alternativa real na busca de uma boa produtividade na agricultura, quando comparada a baixa eficiência do controle de doenças através das técnicas convencionais (Takatsu & Lopes, 1997).

Cook (1985) definiu o controle biológico, como sendo o controle de um patógeno por outros organismos e também pelas plantas superiores. Já Baker (1987) conceituou este tipo de controle como a redução do inóculo ou das atividades da doença provocada por um patógeno, realizada através de um ou mais organismos, incluindo a planta hospedeira, porém excluindo o homem. O controle biológico de doenças de plantas com o emprego de compostos orgânicos pode ser obtido através da manipulação do ambiente, com práticas de manejo que favorecem a comunidade de organismos antagonistas nativos (Hoitink & Boehm, 1999) e de microrganismos selecionados (Melo, 1998).

Segundo Hoitink & Boehm (1999), os resíduos orgânicos podem apresentar vários efeitos benéficos, como contribuir para melhorar as características físico-químicas do solo como fertilizantes orgânicos; melhorar as condições nutricionais, servindo de fontes de energia para os microrganismos; atuando na supressão de doenças causadas por patógenos habitantes do solo, através da biomassa microbiana e de sua atividade.

As atividades antagonistas contra patógeno, desempenhada por organismos vivos, inibe o crescimento e a multiplicação de outro ou até mesmo provocam a sua morte, através de alguns mecanismos básicos, como: competição por nutrientes e por nichos ecológicos; produção de sideróforos; produção de substâncias antimicrobianas, como antibióticos e compostos voláteis tóxicos; parasitismo direto ou predação; e a indução de resistência pelo hospedeiro, com a produção de substâncias inibidoras à colonização (Weller, 1988; Van Loon, 1998; Pal & Gardener, 2006; Romeiro, 2007).

Hoitink & Fahy (1986); Hoper & Alabouvette (1996); Hoitink & Boehm (1999); Weller et al. (2002); Janvier et al. (2007), em suas revisões concluíram que os solos ricos em matéria orgânica têm a tendência de serem supressivos a doenças causadas pelos patógenos do solo. Como mostra no trabalho de Cardoso et al. (2006), onde avaliaram dois compostos orgânicos comerciais e a matéria fresca da parte aérea de guandu e crotalaria nas concentrações de 10, 20 e 30%, incorporados ao solo com *R. solanacearum*, verificaram que a incorporação e incubação por 30 dias com ambas matérias frescas promoveram 100% de controle da murcha, em todas as concentrações avaliadas, já com 60 dias de incubação, apenas a concentração de 10% de matéria fresca não controlou a doença. No entanto, Uesugi & Tomita (2002), estudando diferentes formas de matéria orgânica, no controle da murcha bacteriana do tomateiro, em condições controladas, mostraram que doses crescentes aumentam a incidência da doença, independentemente das formas aplicadas. Satoh & Toyota (2004) verificaram que repetidas aplicações de matéria orgânica no solo nem sempre induz a supressividade da murcha bacteriana do tomateiro, e mencionam ainda que o tipo e a taxa de aplicação podem afetar a supressividade da doença.

Além do uso de compostos orgânicos na supressão de *R. solanacearum*, vários produtos com microrganismos vivos já têm sido comercializados como Agentes de Controle Biológico (BCAs) podendo ser encontrados na forma de pó molhável com *Bacillus subtilis* (Cohn) Y1336, na suspensão em água com *Pseudomonas fluorescens* (Migula) e a mistura de pó e grânulos de *Paenibacillus polymyxa* (Ash, Priest & Colins)

(Sun et al., 2004). No entanto, Xue et al. (2009) relatam que os BCAs não têm sido amplamente aceito como uma alternativa aos antibióticos, por parte dos agricultores.

De acordo com Bashan (1998) a seleção de microrganismos como agentes de biocontrole costuma a ter algum tipo de limitação, uma vez que, quase sempre, o microrganismo selecionado pode apresentar um bom desempenho nos ensaios *in vitro*, razoável em casa de vegetação e limitado em campo. Já Romeiro (2007) não vê a possibilidade de substituir, totalmente e em curto prazo, o uso de defensivos por BCAs, e sim o mais sensato seria utilizar o controle biológico como um dos componentes de uma estratégia global de manejo integrado, visando à redução dos defensivos.

Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado a eficiência no controle da murcha bacteriana do tomateiro, com o uso de agentes de biocontrole. Gava et al. (2002) estudando vários isolados de estreptomicetos, em canteiros infestados com *R. solanacearum*, em casa de vegetação, verificaram-se que o isolado SG 384 apresentou melhor nível de controle, com 48 dias após a semeadura, período no qual todas as testemunhas haviam morrido. Segundo os autores, actinomicetos em geral, e estreptomicetos em particular, têm sido avaliados como BCAs, principalmente por serem reconhecidamente capazes de interagir com as plantas superiores ou mesmo com outras populações microbianas, mediante a produção de antibióticos. Além do mais tem-se observado que algumas espécies de estreptomicetos apresentam a capacidade de proteção, em diferentes plantas, a diversos patógenos do solo, tanto em experimentos em condições controladas quanto no campo (El-Abyad et al., 1993; Yuan & Crawford, 1995; Moura et al., 1998).

Xue et al. (2009) verificaram o potencial de dois BCAs contra a murcha bacteriana do tomateiro, em dois experimentos de campo, na China. Em ambos os experimentos o isolado Xa6 (*Acinetobacter* sp.) apresentou uma eficácia de controle muito melhor do que o isolado Xy3 (*Enterobacter* sp.). Outros trabalhos envolvendo BCAs, na supressão de *R. solanacearum* foram encontrados com bactérias endofíticas (Barreti et al., 2008; Ramesh et al., 2009), com rizobactérias (Guo et al., 2004). De acordo com Hallmann et al. (1997) as bactérias endofíticas utilizadas no biocontrole de doenças apresentam como principais vantagens, de possuírem nicho ecológico similar ao do patógeno e estarem protegidas das diversas influências abióticas. Segundo os autores o tratamento de sementes é o método mais comum de aplicação destes antagonistas. Outros autores também verificaram a eficácia deste tratamento na supressão da bactéria (Moura et al., 1998; Vanitha et al., 2009).

As estratégias de biocontrole de doenças de plantas fazem parte de um manejo integrado constituído por medidas que visam à diminuição da densidade populacional do patógeno, não apenas através do uso de microrganismos antagônicos, mas também com uso de métodos culturais que fornecem ambiente favorável ao desenvolvimento dos antagonistas (Silveira, 2001).

O estudo com bactérias “extremófilas” no controle da murcha bacteriana pode ser uma medida eficaz, visto que são bactérias que sobrevivem em condições mais extremas de temperatura, pH, salinidade e outras mais, sendo aparentemente mais fácil de se estudarem, ao contrário de muitas bactérias antagonistas que apresentam nichos ecológicos similares a muitos fitopatógenos. Diante disto, o presente trabalho visa estudar as bactérias extremófilas facultativas, na supressão de *R. solanacearum*, em condições *in vitro* e *in vivo*.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

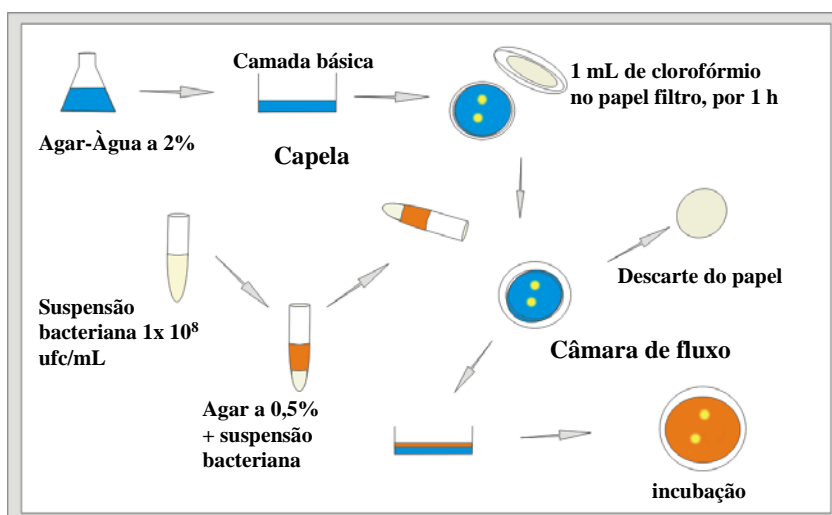
Os experimentos para avaliação da doença foram conduzidos em duas épocas distintas, sendo que o teste *in vitro* foi realizado no mês de maio de 2008 no Laboratório de Fitopatologia, e os ensaios *in vivo* no mês de novembro de 2009 a fevereiro de 2010, na casa de vegetação da Estação Experimental de Biologia, ambos pertencentes à Universidade de Brasília (UnB).

No teste *in vitro* foram utilizados trinta oito isolados obtidos de diferentes solos cultivados e não cultivados, conforme visto na Tabela 1.2 (capítulo 1), e nos ensaios *in vivo* onze isolados, os mesmos utilizados no capítulo 2. Neste estudo foram montados três experimentos, com avaliação individual dos isolados, combinação de dois e combinação de três isolados e todos simultaneamente, conforme o capítulo 2.



## 2.1- Detecção de atividade *in vitro* das bactérias extremófilas facultativas sobre *Ralstonia solanacearum*

Todos os isolados de bactérias extremófilas facultativas que estavam preservados em água foram cultivados em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) sólido (com 2% de ágar) por 24 horas a 28 °C, posteriormente transferidos para outro meio mais novo. Em cada placa foram inoculados dois isolados ‘supostamente’ antagonista, em dois pontos equidistantes e incubados por 48 horas a 28 °C. Em seguida as placas foram levadas para a capela e na parte interna e superior das tampas foi colocado um disco de papel filtro, previamente esterilizados, que foi adicionados 1 mL de clorofórmio para matar as colônias. Após 30 minutos, fez-se o descarte do papel filtro e as placas ficaram entreabertas por mais 30 minutos para a completa evaporação do clorofórmio. A seguir, adicionou-se uma sobrecamada de 5 mL de meio 523 semi-sólido fundente (com 0,5% de ágar), contendo 50 µl da suspensão de *R. solanacearum*, isolado UnB 1173 (considerado virulento), com a concentração de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ mL. Foram preparadas duas placas para cada isolado. Após a incubação a 28 °C por 48 horas, as placas de Petri foram examinadas à procura de halos de inibição indicadores de antibiose, medindo-se com uma régua comum o raio do halo de inibição do crescimento bacteriano em torno de cada isolado. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e a análise estatística aplicada foi o teste de Tukey a 5% de probabilidade. O experimento constou de trinta e oito tratamentos (isolados), com quatro repetições, sendo duas repetições por placa.



**Figura 3.1-** Esquema explicativo do procedimento para execução do teste de antibiose das bactérias extremófilas facultativas sobre *Ralstonia solanacearum*.

## **2.2- Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na supressão de *Ralstonia solanacearum***

Em todos os experimentos conduzidos em casa de vegetação, foram utilizadas no plantio sementes de tomate da cv. Santa Cruz Kada Gigante (considerada suscetível a bactéria *R. solanacearum*), em bandejas de isopor com 200 células, contendo o substrato Plantmax ®. Em cada experimento foram estudados dois sistemas orgânicos: composto (CO) e bokashi (BK), e todo preparo das bandejas foi semelhante à metodologia do item 2.1 (capítulo 2).

Este experimento foi realizado do dia 14 de dezembro de 2009 a 11 de fevereiro de 2010. Neste período, os valores médios registrados da temperatura máxima e mínima foram de 42,4 °C e 17,9 °C, respectivamente; enquanto que os valores médios registrados para a umidade máxima e mínima foram de 83,9% e 16,0%, respectivamente. O objetivo foi avaliar o efeito de cada isolado, na supressão de *R. solanacearum*, em dois sistemas orgânicos. Para cada sistema estudado CO e BK, foi realizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com onze tratamentos que foram os isolados (UnB 1321, UnB 1322, UnB 1323, UnB 1324, UnB 1325, UnB 1326, UnB 1327, UnB 1328, UnB 1329, UnB 1330 e UnB 1331), uma testemunha (tratada somente com *R. solanacearum*), e três repetições.

Após o preparo das bandejas, conforme o item 2.1 (capítulo 2) foi realizada a inoculação dos isolados procedentes de condições extremas, utilizando 100 mL/bandeja de suspensão bacteriana medida na absorbância a 550 nm ( $A_{550} = 0,7$  a  $0,8$ ), que se refere à concentração de  $6 \times 10^8$  UFC/mL (conforme o item 2.2 do capítulo 2).

O transplante das mudas de tomate foi realizado com 15 dias após a germinação (DAG), transplantando dez mudas por bandejas. A inoculação de *R. solanacearum* foi realizada com 13 DAT.

### **2.2.1- Inoculação de *R. solanacearum***

Foi preparada uma suspensão bacteriana obtida de culturas com 48 horas, após o preparo foi inoculada 100 mL/ bandeja, na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/ mL, correspondendo uma absorbância ( $A_{550}$ ) de 0,7-0,8. A inoculação foi feita no solo, na base do caule de cada planta.

### 2.2.2- Avaliações

Para avaliação do crescimento das plantas após a inoculação de *R. solanacearum*, foram realizadas três leituras semanalmente, com 7, 14 e 21 DAI medindo a altura de cada planta desde a base até a última brotação; visto que um dos sintomas provocados pela bactéria é o nanismo. Foi também avaliado o número de plantas mortas, com quatro avaliações semanalmente, 7, 14, 21 e 28 DAI e, com os dados obtidos foram construídas curvas de progresso da doença, e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) segundo o modelo matemático de Maffia, Universidade Federal de Viçosa. A partir desta, com o auxílio de técnicas estatísticas, ASSISTAT versão 7.5 beta (2008) (Silva, 2009), realizaram-se as análises de variância, seguida pelo teste de comparação de médias, Tukey, ao nível de 5% de probabilidade para avaliação do crescimento das plantas e o teste *t* (5%) para análise da AACPD. Os dados da AACPD foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$ .

### 2.3- Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na supressão de *Ralstonia solanacearum*

O experimento foi realizado do dia 09 de novembro a 23 de dezembro de 2009. O objetivo foi avaliar o efeito da combinação de dois isolados, na supressão de *R. solanacearum*, em dois sistemas orgânicos CO e BK. Neste período, os valores médios registrados da temperatura máxima e mínima foram de 41,0 °C e 18,7 °C, respectivamente; enquanto que os valores médios registrados para a umidade máxima e mínima foram de 89,0% e 18,5%, respectivamente.

Para cada sistema estudado CO e BK foram realizados o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com doze tratamentos, uma testemunha (tratada somente com *R. solanacearum*), e três repetições. As combinações dos isolados foram semelhantes aquelas usadas no experimento 2 da promoção do crescimento (item 2.3 do capítulo 2). Assim para o sistema CO foram usadas doze combinações diferentes: **1-** UnB 1327 + UnB 1324, **2-** UnB 1327 + UnB 1330, **3-** UnB 1324 + UnB 1323, **4-** UnB 1330 + UnB 1329, **5-** UnB 1323 + UnB 1322, **6-** UnB 1329 + UnB 1321, **7-** UnB 1322 + UnB 1325, **8-** UnB 1321 + UnB 1331, **9-** UnB 1325 + UnB 1328, **10-** UnB 1331 + UnB 1326, **11-** UnB 1328 + UnB 1326 e **12-** UnB 1327 + UnB 1326. E no sistema BK

mais doze combinações: **1-** UnB 1327 + UnB 1324, **2-** UnB 1327 + UnB 1321, **3-** UnB 1324 + UnB 1328, **4-** UnB 1321 + UnB 1326, **5-** UnB 1328 + UnB 1329, **6-** UnB 1326 + UnB 1330, **7-** UnB 1329 + UnB 1322, **8-** UnB 1330 + UnB 1323, **9-** UnB 1322 + UnB 1331, **10-** UnB 1323 + UnB 1325, **11-** UnB 1325 + UnB 1331 e **12-** UnB 1327 + UnB 1331.

Toda a parte de preparo das bandejas e a inoculação dos isolados de condições extremas foram realizadas conforme o item 2.1 e o 2.3 do capítulo 2.

O transplante das mudas de tomate foi realizado com 15 dias após a germinação (DAG), transplantando dez mudas por bandejas. A inoculação de *R. solanacearum* foi realizada com 3 DAT, quando as plantas ainda estavam pequenas. A inoculação da bactéria e todo procedimento de avaliação da doença foram semelhantes o descrito no item 2.2.1 e 2.2.2 do experimento 1.

#### **2.4- Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos isolados bacterianos na supressão de *Ralstonia solanacearum***

O experimento foi realizado do dia 04 de janeiro a 26 de fevereiro de 2010. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da combinação de três isolados e com todos onze isolados inoculados simultaneamente, para verificar a supressão de *R. solanacearum*, em dois sistemas orgânicos CO e BK. Neste período, os valores médios registrados da temperatura máxima e mínima foram de 43,5 °C e 17,2 °C, respectivamente; enquanto que os valores médios registrados para a umidade máxima e mínima foram de 81,2% e 13,6%, respectivamente.

Para cada sistema estudado CO e BK foram realizados o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos que foram a combinação de três isolados e mais uma combinação de onze isolados simultaneamente, uma testemunha (tratada somente com *R. solanacearum*), e três repetições. As combinações dos isolados foram semelhantes aquelas usadas no experimento 3 da promoção do crescimento (item 2.4 do capítulo 2). Assim para o sistema CO: **1-** UnB 1327 + UnB 1324 + UnB 1330, **2-** UnB 1322 + UnB 1321 + UnB 1325 e **3-** UnB 1331 + UnB 1326 + UnB 1328; e para o sistema BK: **1-** UnB 1327 + UnB 1324 + UnB 1321; **2-** UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 e **3-** UnB 1331 + UnB 1325 + UnB 1323.

Toda a parte de preparo das bandejas e a inoculação dos isolados de condições extremas foram realizadas conforme o item 2.1 e o 2.4 do capítulo 2.

A inoculação de *R. solanacearum* e o procedimento de avaliação da doença estão descritos no item 2.2.1 e 2.2.2 do experimento 1. O transplante das mudas de tomate foi realizado com 12 dias após a germinação (DAG), transplantando dez mudas por bandejas. A inoculação de *R. solanacearum* foi realizada com 5 DAT, quando as plantas ainda estavam pequenas. A inoculação da bactéria e todo procedimento de avaliação da doença foram semelhantes o descrito no item 2.2.1 e 2.2.2 do experimento 1. Os dados obtidos com a avaliação da altura das plantas, AACPD e a percentagem de plantas mortas aos 28 DAI foram realizados com análises de variância, seguida pelo teste de comparação de médias, teste *t* (5%). Os dados da AACPD foram transformados para  $\sqrt{x+0,5}$ .

### **3- RESULTADOS**

#### **3.1- Detecção de atividade *in vitro* das bactérias extremófilas facultativas sobre *Ralstonia solanacearum***

Dos trinta e oito isolados submetidos ao teste para detecção de antibiose, verificou-se que nove isolados inibiram o patógeno desafiante. Destes quatro isolados UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.), 1322 (*Enterobacter* sp.), 1328 (*Pseudomonas* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.) foram estudados na promoção do crescimento das plantas, visto no capítulo 2 e em estudos na supressão da bactéria, em casa de vegetação.

O isolado UnB 1357 obtido de amostras de solos cultivados com crotalária apresentou maior média do raio do halo de inibição (26,75 mm) para *R. solanacearum*, diferindo significativamente da maioria dos tratamentos, com exceção dos isolados UnB 1341, 1339 e 1336 (Tabela 3.1).

Os isolados UnB 1329, 1322 e 1328 não diferiram entre si, embora tenham sido obtidos da mesma amostra de solos (UnB 1329 e UnB 1322) foram identificados como bactérias pertencentes a diferentes gêneros *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp., respectivamente. Entretanto, o isolado UnB 1324, oriundo de amostra de solos do cerrado e identificado como *Enterobacter* sp. apresentou menor média do raio do halo de inibição, diferindo significativamente de todos os demais tratamentos (Tabela 3.1).

Verificou-se que do isolado UnB 1321 até o isolado UnB 1358 nenhum destes foram capazes de inibir o crescimento da bactéria (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1-** Avaliação do potencial de inibição do crescimento de *Ralstonia solanacearum* através do halo inibitório.

<b>Tratamentos</b>	<b>Plantas encontradas na época da coleta ou tipo de solo</b>	<b>Média do RHI* (mm)</b>
UnB 1357	Crotalária ( <i>Crotalaria juncea</i> )	26,75 a**
UnB 1341	Composto Orgânico	26,50 ab
UnB 1339	Bokashi	26,00 ab
UnB 1336	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	24,75 ab
UnB 1352	Maracujá c/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	23,25 bc
UnB 1329	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	21,25 cd
UnB 1322	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	21,00 cd
UnB 1328	Bokashi	18,50 d
UnB 1324	Cerrado	14,67 e
UnB 1321	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1323	Bokashi	0,00 f
UnB 1325	Milho ( <i>Zea mays</i> )	0,00 f
UnB 1326	Pimentão ( <i>Capsicum annum</i> )	0,00 f
UnB 1327	Crotalária ( <i>Crotalaria juncea</i> )	0,00 f
UnB 1330	Bokashi	0,00 f
UnB 1331	Composto Orgânico	0,00 f
UnB 1332	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1333	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1334	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1335	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1337	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1338	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )	0,00 f
UnB 1340	Composto Orgânico	0,00 f
UnB 1342	Maracujá s/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1343	Maracujá s/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1344	Maracujá s/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1345	Maracujá s/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1346	Maracujá s/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1347	Milho ( <i>Zea mays</i> )	0,00 f
UnB 1348	Milho ( <i>Zea mays</i> )	0,00 f
UnB 1349	Milho ( <i>Zea mays</i> )	0,00 f
UnB 1350	Milho ( <i>Zea mays</i> )	0,00 f
UnB 1351	Milho ( <i>Zea mays</i> )	0,00 f
UnB 1353	Maracujá c/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1354	Maracujá c/MO ( <i>Passiflora edulis</i> )	0,00 f
UnB 1355	Pimentão ( <i>Capsicum annum</i> )	0,00 f
UnB 1356	Crotalária ( <i>Crotalaria juncea</i> )	0,00 f
UnB 1358	Crotalária ( <i>Crotalaria juncea</i> )	0,00 f
<b>CV (%)</b>		<b>23,86</b>

\* RHI- Raio do Halo de Inibição

\*\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

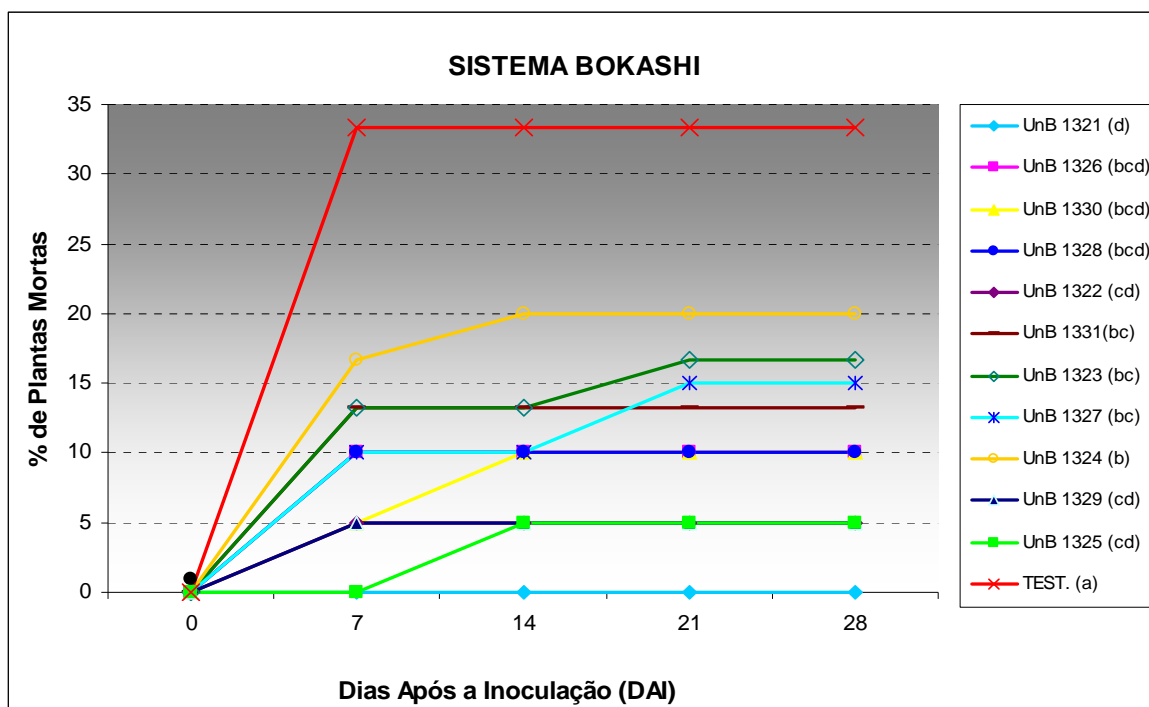
### **3.2- Experimento 1- Efeito individual dos isolados bacterianos na supressão de *Ralstonia solanacearum***

No presente estudo, verificou-se que em ambos os sistemas orgânicos, a maioria dos isolados de bactérias extremófilas facultativas apresentaram uma constância na incidência da doença até o final da avaliação, com 28 DAI. No entanto, é interessante observar que o progresso da doença ocorreu em poucos tratamentos, e normalmente do sétimo ao décimo quarto dia ou do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia após a inoculação.

Quando se avaliou o crescimento das plantas de tomate após terem sido inoculadas com *R. solanacearum*, verificou-se também que em ambos os sistemas orgânicos houve diferenças significativas entre alguns tratamentos, mostrando que alguns isolados de bactérias extremófilas facultativas apresentaram comportamentos diferenciados no crescimento das plantas, sendo conducentes ou supressivos a bactéria. Como visto anteriormente, que um dos sintomas provocados pela bactéria é o retardamento das plantas.

No sistema BK, analisando o percentual de plantas mortas aos 28 DAI, verificou-se que a testemunha, que havia sido inoculada somente com a bactéria *R. solanacearum* promoveu 33% de plantas mortas, diferindo significativamente de todos os demais tratamentos. O isolado UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) apresentou 100% de controle da murcha bacteriana, porém foi totalmente distintos do UnB 1331 (*Chysoobacterium* sp.), 1323 (*Enterobacter* sp.), 1327 (*Klebsiella* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.), apresentando respectivamente 13%, 16%, 15% e 20% de plantas mortas. Ao analisar somente em relação à testemunha, houve uma destacada redução do percentual de plantas mortas com a incorporação dos isolados UnB 1322 (*Enterobacter* sp.), 1329 (*Pseudomonas* sp.) e 1325 (*Klebsiella* sp.) e entre este grupo não houve diferença estatística (Figura 3.2).





**Figura 3.2-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento individual, no sistema Bokashi, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%).

Ao observar os resultados da AACPD, neste mesmo sistema orgânico, novamente a testemunha foi significativamente diferente dos demais, com níveis de progresso da doença muito superior a todos os demais tratamentos, exceto para o UnB 1324 (*Enterobacter* sp.). Os isolados UnB 1322 (*Enterobacter* sp.), 1329 (*Pseudomonas* sp.) e 1325 (*Klebsiella* sp.), apresentaram uma maior tendência na contenção da murcha bacteriana (Tabela 3.2).

Analisando o crescimento das plantas de tomate, aos 21 DAI com *R. solanacearum*, no sistema BK, observou-se que alguns isolados foram mais supressivos a bactéria apresentando menor percentagem de plantas mortas, menor AACPD e conseqüentemente uma maior média na altura das plantas, como é o caso dos isolados UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) e 1325 (*Klebsiella* sp.). Por outro lado, os isolados UnB 1326 (*Klebsiella* sp.), 1328 (*Pseudomonas* sp.), 1331 (*Chryseobacterium* sp.) e 1324 (*Enterobacter* sp.) que foram significativamente semelhantes e distintos do UnB 1325 (*Klebsiella* sp.), mostraram uma redução no crescimento de 54%, 50,6%, 48,1% e 42,1%, respectivamente, em relação ao tratamento UnB 1325, e conseqüentemente maiores percentagens de plantas mortas (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2-** Avaliação da altura das plantas de tomate, com 21 dias após a inoculação de *Ralstonia solanacearum*, e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em diferentes sistemas orgânicos, no experimento individual.

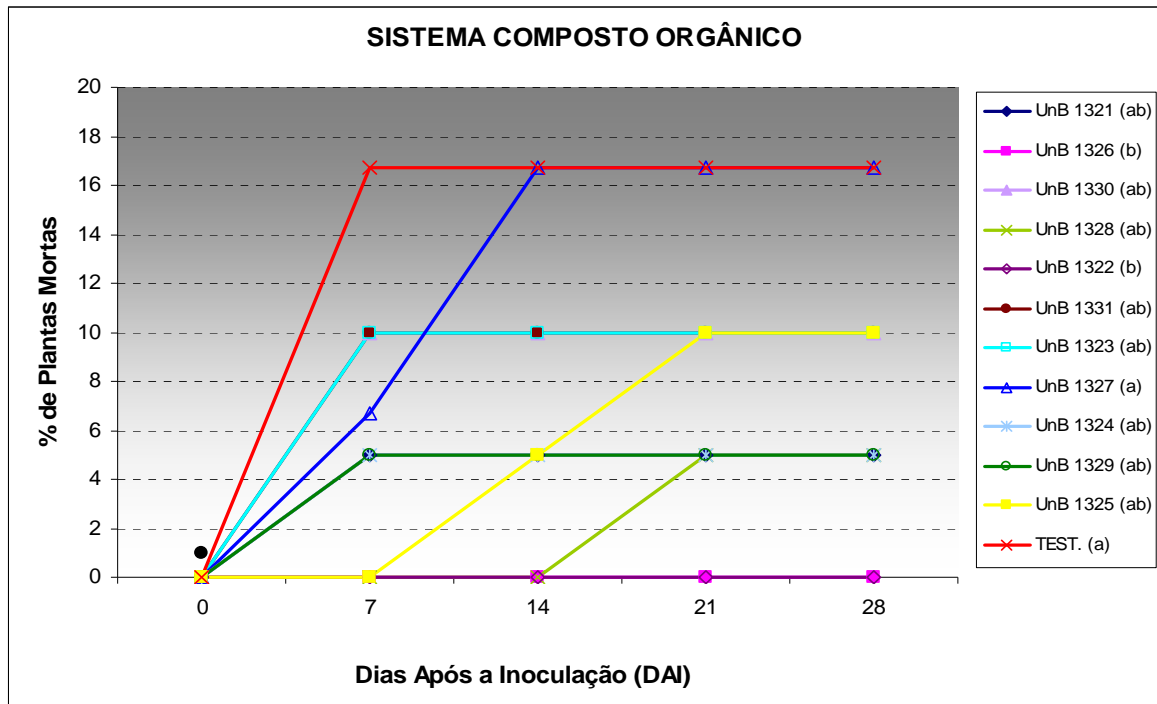
Tratamentos	Sistema Bokashi		Sistema Composto Orgânico	
	Média da Altura (cm) <sup>1</sup>	AACPD	Média da Altura (cm)	AACPD <sup>2</sup>
UnB 1321	26,10 abc*	0,00 e	24,86 ab	19,95 ab
UnB 1326	15,51 c	25,20 bcd	22,63 b	0,00 c
UnB 1330	32,03 ab	27,43 bcd	23,49 ab	25,20 ab
UnB 1328	16,68 c	25,20 bcd	26,32 ab	17,30 b
UnB 1322	32,92 ab	19,95 cd	25,63 ab	0,00 c
UnB 1331	17,52 c	28,00 bcd	27,07 ab	25,20 ab
UnB 1323	22,56 abc	29,03 bc	23,90 ab	25,20 ab
UnB 1327	20,26 bc	27,30 bcd	24,84 ab	29,30 a
UnB 1324	19,53 c	32,90 ab	32,92 a	19,95 ab
UnB 1329	26,36 abc	19,95 cd	18,03 b	19,95 ab
UnB 1325	33,77 a	19,10 d	28,23 ab	21,15 ab
Test.	21,35 abc	41,30 a	21,48 b	30,10 a
CV (%)	13,93	21,18	11,81	27,24

\* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey (altura) e o teste *t* (AACPD), 5% de probabilidade.

1- Média de três repetições

2- Área abaixo da curva de progresso da doença, com valores transformados  $\sqrt{x+0,5}$

Já no sistema CO, a inoculação de diferentes tipos de isolados, mostrou melhor controle da bacteriose, comparada ao sistema BK. Os tratamentos com os isolados UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1322 (*Enterobacter* sp.), mostraram 100% de controle diferindo estatisticamente dos tratamentos UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e da testemunha, que ambas foram significativamente semelhantes apresentando maior percentual de plantas mortas aos 28 DAI. Entretanto, estes três isolados e mais a testemunha, foram indiferentes aos demais tratamentos que formaram o grupo intermediário (Figura 3.3).



**Figura 3.3-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento individual, no sistema Composto Orgânico, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%).

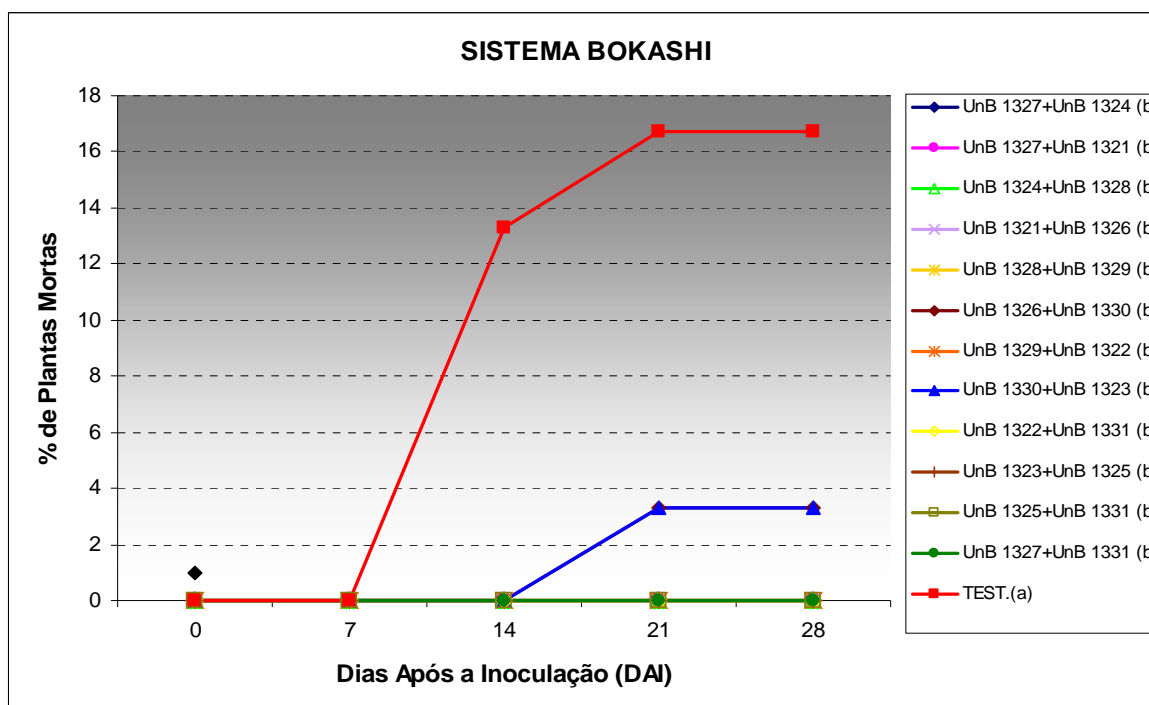
O estudo da AACPD, neste mesmo sistema orgânico, também destacou o tratamento UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e a testemunha, apresentando o maior progresso da doença, diferenciando significativamente do UnB 1326 (*Klebsiella* sp.), 1328 (*Pseudomonas* sp.), 1322 (*Enterobacter* sp.), porém indiferente em AACPD entre os demais tratamentos (Tabela 3.2).

No sistema CO, com relação ao crescimento das plantas de tomate aos 21 DAI, o isolado UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) mostrou ser mais supressivo no controle da bacteriose apresentando um maior desenvolvimento das plantas diferenciando significativamente dos tratamentos UnB 1326 (*Klebsiella* sp.), UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) e da testemunha, que mostraram uma leve influência da bactéria no retardamento das plantas, principalmente para o isolado UnB 1329 que apresentou uma redução de 45,2% em relação ao UnB 1324. Os demais isolados mostraram um bom crescimento das plantas sendo significativamente semelhantes a todos os tratamentos, e não influenciados pela bactéria (Tabela 3.2).

### 3.3- Experimento 2- Efeito combinado de dois isolados bacterianos na supressão de *Ralstonia solanacearum*

Neste estudo da combinação de dois isolados de bactérias extremófilas facultativas, na supressão de *R. solanacearum*, verificou-se que em ambos os sistemas orgânicos quase todos os isolados apresentaram um controle da bactéria, quando comparado com a testemunha.

No sistema BK, analisando o comportamento geral da combinação dos isolados, comparativamente à testemunha, verificou-se que todas as combinações de isolados foram significativamente semelhantes, diferindo apenas da testemunha que apresentou maior percentual de plantas mortas, aos 28 DAI. Os tratamentos UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) mostraram uma redução de 96,7% da incidência da murcha bacteriana, enquanto que as demais combinações com 100% de controle. A testemunha mostrou um progresso da doença somente aos 14 DAI, chegando aos 28 DAI com 17% de plantas mortas (Figura 3.4).



**Figura 3.4-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de dois, no sistema Bokashi, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste *t* 5%).

Analisando a AACPD, no sistema BK, mais uma vez a evolução da incidência no decorrer do tempo foi maior na testemunha, diferenciando significativamente dos demais tratamentos. As combinações dos isolados UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) e UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) apresentaram menores AACPD, diferenciando de todos os demais tratamentos, inclusive das dez combinações de isolados que apresentaram 100% de controle da bacteriose (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3-** Avaliação da altura das plantas de tomate, com 21 dias após a inoculação de *Ralstonia solanacearum*, e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em diferentes sistemas orgânicos, no experimento combinado de dois.

<b>Sistema Bokashi</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Média da Altura (cm)<sup>1</sup></b>	<b>AACPD<sup>2</sup></b>
UnB 1327+UnB 1321	32,93 a*	0,00 d
UnB 1325+UnB 1331	31,24 a	0,00 d
UnB 1327+UnB 1324	30,05 a	0,00 d
UnB 1330+UnB 1323	28,43 a	16,45 c
UnB 1323+UnB 1325	28,00 a	0,00 d
UnB 1326+UnB 1330	27,50 a	16,45 c
UnB 1324+UnB 1328	27,34 a	0,00d
UnB 1321+UnB 1326	26,91 a	0,00 d
UnB 1329+UnB 1322	26,72 ab	0,00 d
UnB 1328+UnB 1329	25,86 ab	0,00 d
UnB 1327+UnB 1331	25,79 abc	0,00 d
UnB 1322+UnB 1331	25,69 abc	0,00 d
Test.	16,27 bc	27,23 b
CV(%)	11,02	22,11
<b>Sistema Composto Orgânico</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Média da Altura (cm)<sup>1</sup></b>	<b>AACPD<sup>2</sup></b>
UnB 1331+UnB 1326	36,10 a*	0,00 d
UnB 1325+UnB 1328	35,27 a	0,00 d
UnB 1327+UnB 1330	34,11 a	0,00 d
UnB 1327+UnB 1326	33,47 ab	0,00 d
UnB 1328+UnB 1326	32,11 ab	0,00 d
UnB 1329+UnB 1321	31,63 ab	0,00 d
UnB 1322+UnB 1325	31,53 ab	0,00 d
UnB 1327+UnB 1324	31,49 ab	0,00 d
UnB 1323+UnB 1322	29,93 ab	0,00 d
UnB 1321+UnB 1331	26,54 abc	17,30 c
UnB 1324+UnB 1323	25,34 abc	35,05 ab
UnB 1330+UnB 1329	24,14 bc	19,10 c
Test.	13,09 d	32,57 b
CV(%)	11,35	26,81

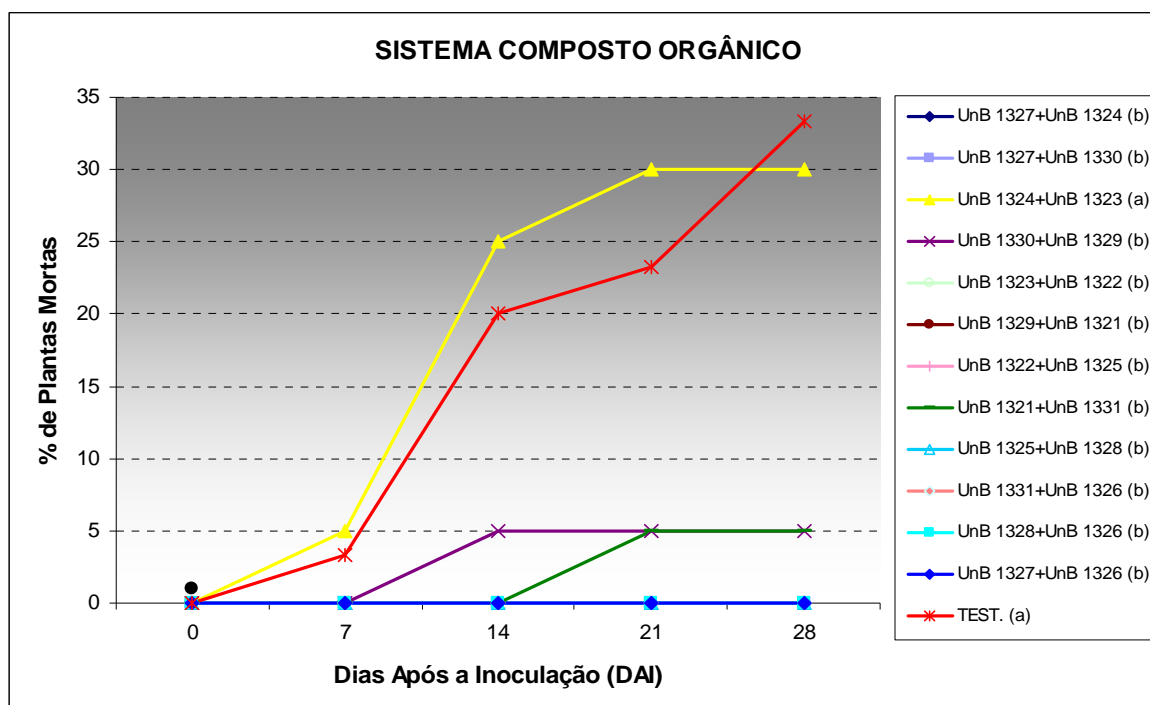
\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey (altura) e o teste *t* (AACPD), 5% probabilidade.

1- Média de três repetições

2- Área abaixo da curva de progresso da doença, com valores transformados  $\sqrt{x+0,5}$

Quando as plantas de tomate foram inoculadas com *R. solanacearum*, no sistema BK, as plantas como testemunha apresentaram menor média na altura, diferenciando significativamente de quase todos os tratamentos, com exceção da combinação UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) e UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.). No entanto, estas duas combinações de isolados foram significativamente semelhantes a todos as demais combinações (Tabela 3.3).

No sistema CO, os tratamentos UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.) (30%), e a testemunha (com aproximadamente 35%) foram significativamente superiores em percentual de plantas mortas aos 28 DAI, que os tratamentos UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) e UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.), que ambas com 5% de plantas mortas foram estatisticamente semelhantes a todos os demais tratamentos, que apresentaram 100% de controle da bacteriose. A testemunha, assim como a combinação dos isolados UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.), não diferiram entre si, mostrando um progresso da doença desde a primeira semana de avaliação (Figura 3.5).



**Figura 3.5-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de dois, no sistema Composto Orgânico, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%).

Quando se analisou a AACPD sobre diferentes combinações de isolados de bactérias extremófilas facultativas, neste mesmo sistema orgânico, novamente a testemunha destacou-se com maior AACPD diferindo de todos os tratamentos, com exceção do UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1323 (*Enterobacter* sp.). As combinações UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) e UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) foram os tratamentos que apresentaram menor AACPD, as demais combinações de isolados não diferiram entre si e mostraram AACPD igual a zero, comprovando que podem ser isolados supressivos da murcha bacteriana (Tabela 3.3).

Em relação ao desenvolvimento das plantas de tomate, após a inoculação de *R. solanacearum*, no sistema CO, a testemunha foi significativamente diferente e inferior a todos os demais tratamentos, mostrando uma redução no crescimento de 54,0% e de 63,7%, em relação ao tratamento UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) que apresentou maior média na altura das plantas (36,10 cm), embora não diferisse de todas as combinações de isolados, com exceção do tratamento UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) + UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) (Tabela 3.3).

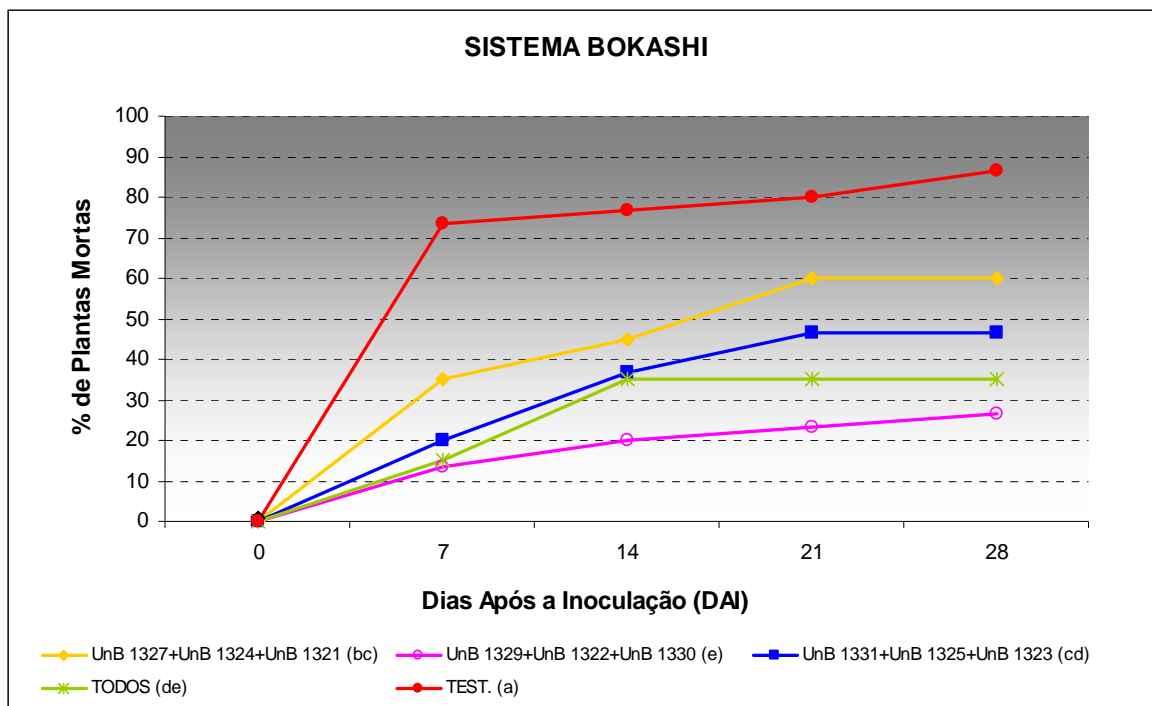
### **3.4- Experimento 3- Efeito combinado de três e com todos isolados bacterianos na supressão de *Ralstonia solanacearum***

No presente estudo, verificou-se que em ambos os sistemas orgânicos todos os tratamentos foram bastante afetados pela murcha bacteriana, assim como também o desenvolvimento das plantas de tomate, que apresentaram menores médias na altura, comparado aos experimentos anteriores.

No sistema BK, analisando o desenvolvimento da doença ao longo do tempo, verificou-se que a testemunha apresentou maior percentagem de plantas mortas, desde a primeira semana de avaliação até aos 28 DAI, sendo significativamente distinta de todos os tratamentos, que se mostrou ainda significativamente superior que a combinação de isolados UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.), sendo esta estatisticamente semelhante ao tratamento inoculado com TODOS isolados simultaneamente. O dano causado pela murcha bacteriana com a combinação UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 foi de 31% inferior que a testemunha,



apresentando aproximadamente 27% e 87% de plantas mortas, respectivamente (Figura 3.6).



**Figura 3.6-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de três e com todos isolados simultaneamente, no sistema Bokashi, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%).

Ao analisar a AACPD, observou-se que a testemunha diferiu dos demais, causando maior incidência no decorrer do tempo, principalmente do tratamento UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e TODOS, que apresentaram as menores AACPD. Dentre elas o UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 mostrou ser mais supressivo ao patógeno, porém não diferenciou significativamente do tratamento com todos isolados, que estava dentro do grupo que conteve melhor progresso da murcha bacteriana (Tabela 3.4).

**Tabela 3.4-** Avaliação da altura das plantas de tomate, com 21 dias após a inoculação de *Ralstonia solanacearum*, e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em diferentes sistemas orgânicos, no experimento combinado de três e todos simultaneamente.

<b>Sistema Bokashi</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Média da Altura (cm)<sup>1</sup></b>	<b>AACPD<sup>2</sup></b>
UnB 1329+UnB 1322+UnB 1330	23,65 a	33,53 d
TODOS	21,50 ab	39,90 cd
UnB 1327+UnB 1324+UnB 1321	17,02 abc	48,50 bc
UnB 1331+UnB 1325+UnB 1323	16,57 abc	42,20 c
Test.	9,09 c	60,43 a
CV(%)	24,56	10,19
<b>Sistema Composto Orgânico</b>		
<b>Tratamentos</b>	<b>Média da Altura (cm)<sup>1</sup></b>	<b>AACPD<sup>2</sup></b>
TODOS	17,31 a	50,40 ab
UnB 1331+UnB 1326+UnB 1328	14,26 ab	43,20 ab
Test.	13,61 ab	42,20 b
UnB 1322+UnB 1321+UnB 1325	11,83 b	50,40 ab
UnB 1327+UnB 1324+UnB 1330	10,55 b	55,77 a
CV(%)	17,17	13,81

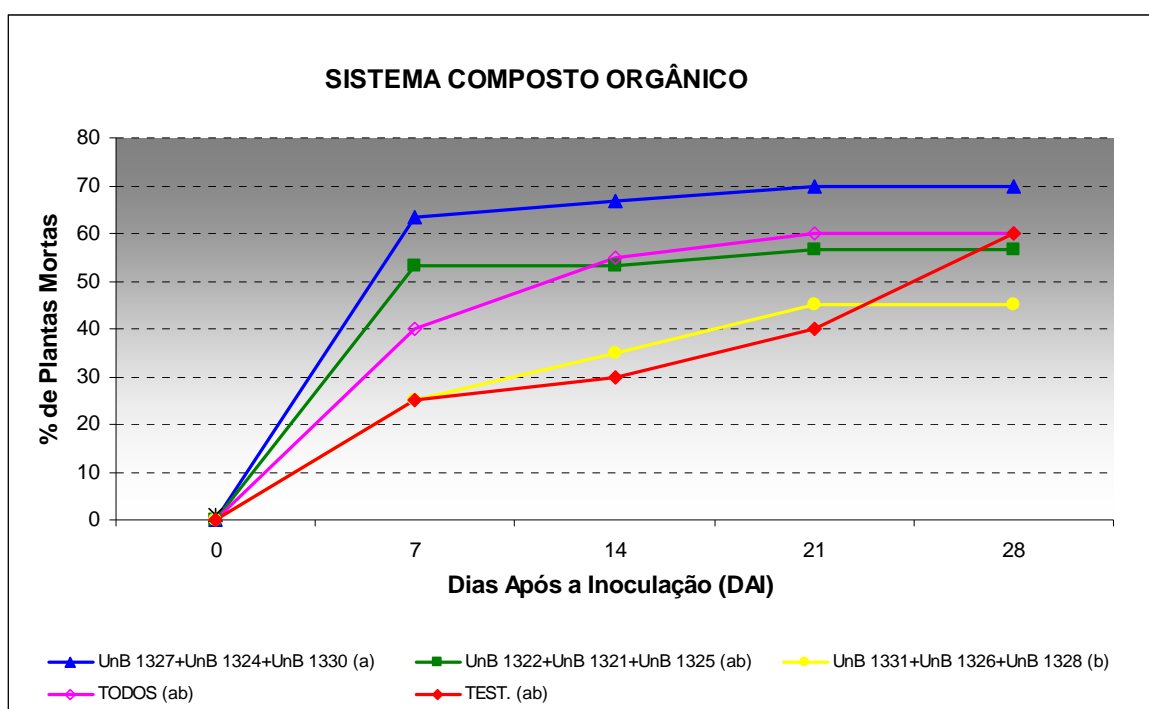
\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, de acordo com o teste *t* (altura e AACPD), 5% probabilidade.

1- Média de três repetições

2- Área abaixo da curva de progresso da doença, com valores transformados  $\sqrt{x+0,5}$

Avaliando o desenvolvimento das plantas após a inoculação de *R. solanacearum*, no sistema BK, observou-se que o tratamento com maior percentagem de plantas mortas que foi a testemunha (87%), apresentou aos 21 DAI menor média na altura das plantas (9,09 cm) comprovando que a bactéria pode realmente causar nanismo nas plantas de tomate. A testemunha foi significativamente distinta do tratamento com a combinação UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) e TODOS que apresentaram maiores médias no crescimento das plantas, porém estas combinações foram significativamente semelhante a todos os demais tratamentos (Tabela 3.4).

Estudando o sistema CO, observou-se que a incidência da doença foi maior no tratamento com a combinação de isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.), apresentando 70% de plantas mortas, aos 28 DAI, diferindo significativamente do tratamento com a combinação UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.) que limitaram a murcha em 45%. No entanto, ambas as combinações de isolados foram estatisticamente semelhantes a todos os demais tratamentos, inclusive da testemunha (Figura 3.7).



**Figura 3.7-** Curva de progresso da murcha bacteriana em tomateiro, em experimento combinado de três e com todos isolados simultaneamente, no sistema Composto Orgânico, com diferentes tipos de isolados de bactérias extremófilas facultativas, analisados num período de 28 DAI. Os tipos de isolados seguidas pelas mesmas letras nos ( ) não diferem estatisticamente (teste  $t$  5%).

Analisando a AACPD, no sistema CO, observou-se que a combinação dos isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) apresentou maior AACPD, diferindo da testemunha com menor área; porém não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 3.4).

Em relação à altura das plantas inoculadas com *R. solanacearum* neste mesmo sistema orgânico, observou-se que o tratamento com TODOS os isolados de bactérias

extremófilas facultativas, inoculados simultaneamente, apresentou maior média na altura das plantas, sendo significativamente distinto das combinações UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1325 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.). Entretanto, o tratamento com TODOS não apresentou diferenças estatisticamente da combinação UnB 1331 (*Chryseobacterium* sp.) + UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) + UnB 1328 (*Pseudomonas* sp.) e da testemunha (Tabela 3.4).

#### 4- DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a supressão da murcha bacteriana do tomateiro com o uso de isolados de bactérias extremófilas facultativas, em diferentes formas de aplicação, para o controle de *R. solanacearum* em condições controladas, e em testes *in vitro*; além de demonstrar os efeitos benéficos dos isolados, no desenvolvimento das plantas de tomate, após a inoculação do patógeno desafiante.

No estudo da atividade *in vitro*, dos trinta e oito isolados de bactérias extremófilas facultativas, somente nove foram capazes de inibir o crescimento de *R. solanacearum* e destes, quatro (UnB 1329, 1322, 1328 e 1324) foram estudados em condições *in vivo*, no experimento individual, em casa de vegetação, onde apresentaram controle da bacteriose do tomateiro. Barreti et al. (2008) estudando dez isolados de bactérias endofíticas, em teste *in vitro*, no controle de *R. solanacearum*, verificaram que somente dois isolados inibiram o crescimento do patógeno. Entretanto, em estudos *in vivo*, em condições controladas, dois isolados que haviam mostrado efeito negativo para inibição da bactéria, mostraram eficientes antagonistas para o biocontrole da murcha bacteriana (Barreti 2001, citado por Romeiro et al. 2000, 2007). Estes dados confirmam que a supressão *in vitro* pode não estar necessariamente relacionada com o comportamento do isolado estudado em casa de vegetação ou em campo. Segundo Romeiro (2007) o fato de alguns endófitos exercerem atividade antagonística contra fitopatógenos, em bioensaios *in vitro*, pode sugerir uma potencialidade como agentes de biocontrole, embora estes resultados apenas possuem importância relativa e controversa.

Nos experimentos avaliados, em casa de vegetação, com diferentes isolados de bactérias, verificou-se que em todos os experimentos a maioria dos isolados mostrou algum efeito no biocontrole da murcha bacteriana do tomateiro, quando comparado com

a testemunha. De uma maneira geral, o que se parece que a forma de aplicação dos isolados foi um fator decisivo na supressão do patógeno, além de outros fatores ambientais como temperatura, umidade e a idade da planta que foi inoculada, também foram importantes na manifestação da doença. Ao se comparar os três experimentos: (1) individual, (2) combinado de dois e (3) combinado de três e com todos isolados simultaneamente; observou-se que o experimento 3, independentemente do tipo de sistema orgânico, foi o que apresentou maior incidência de plantas mortas, inclusive na testemunha; enquanto que o experimento 2 mostrou melhor efeito dos isolados na supressão da bacteriose. Quando se avaliou outros efeitos, com exceção do experimento 1, verificou-se que a idade das plantas quando foram submetidas a inoculação de *R. solanacearum* foram praticamente a mesma, com 18 dias do plantio a inoculação; porém a média da temperatura máxima foi maior no experimento 3. Este fato mostra que embora as plantas estivessem na mesma idade, as plantas do experimento 3 apresentaram um crescimento aos 21 DAI bem inferior, comparado com as do experimento 2; o que pode ter ocorrido provavelmente pela temperatura máxima mais elevada e pela combinação de vários isolados.

Guo et al. (2004) estudando três isolados de rizobactérias (PGPR) no controle da murcha bacteriana do tomateiro, em diferentes localidades, verificaram-se que a temperatura e umidade foram fatores importantes na eficácia do controle biológico. Aproximadamente 30 dias após o transplante, em casa de vegetação, a temperatura e umidade foram superiores a 30 °C e 90%, respectivamente, fazendo com que a doença desenvolvesse imediatamente, diminuindo a população de PGPR. Segundo Botelho & Mendonça-Hagler (2006), em condições de campo, a eficiência dos agentes de controle biológico depende do tempo de aplicação, da idade da planta, do modo de aplicação e outros fatores.

No experimento individual, a maioria dos isolados de bactérias extremófilas facultativas foram supressivos a *R. solanacearum*, independentemente do sistema orgânico utilizado. Como exemplo, os isolados UnB 1328 e 1329 ambos identificados como *Pseudomonas* do grupo fluorescentes, apresentaram baixa percentagem de plantas mortas, quando comparadas com a testemunha. Ramesh et al. (2009) estudando diferentes bactérias endofíticas, no controle de *R. solanacearum* em plantas de berinjela, em casa de vegetação, verificaram que as plantas tratadas com isolados de *Pseudomonas* (EB9, EB67), de *Enterobacter* (EB44, EB89) e de *Bacillus* (EC4 e EC 13) reduziram a incidência da murcha em mais de 70%. Segundo os autores, os

antagonistas selecionados produziram um antibiótico, DAPG que inibiu o patógeno desafiante sobre condições *in vitro* e que provavelmente podem ter sido responsáveis pela redução da doença em condições *in vivo*. Resultados semelhantes foram realizados por Vanitha et al. (2009) onde mencionam que *P. fluorescens* pode ser um indutor de resistência sistêmica ou antagonista a *R. solanacearum*.

Chin-A-Woeng et al. (2003) comentam que bactérias como as espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, são muito versáteis em produzir substâncias antimicrobianas com propriedades antifúngicas e antibacterianas, como fenazinas, acetilfloroglucinol, oomicina, antranilatos, pioluteorina, pioverdinas, amônias, pioquelinas, entre outras. De acordo com Wipps (2001) *P. fluorescens*, isolamento F113, promoveu o biocontrole de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* em batata graças à produção de DAPG (2,4-diacetil-floroglucinol). Bactérias produtoras de fenazina como *P.aeruginosa*, são dotadas de eficientes superóxido-desmutases como forma de auto proteção (Romeiro, 2007).

Analisando alguns isolados no experimento 1 deste estudo, e comparando-se com o estudo da promoção do crescimento das plantas de tomate (cap. 2) observou-se que os mesmos isolados podem se comportar de forma diferenciada, ou seja, podem ser utilizados apenas na promoção do crescimento de plantas ou somente como agentes de biocontrole, ou ainda serem eficientes em ambos os estudos. É o caso, por exemplo, do isolado UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) que em ambos sistemas orgânicos mostrou ser conducente a doença; no entanto quando se avaliou este mesmo isolado no estudo da promoção do crescimento (cap. 2), verificou-se a eficiência do mesmo no crescimento das plantas de tomate. Já o isolado UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) observando somente o sistema CO, mostrou ser eficiente tanto na supressão da doença quanto na promoção do crescimento.

Estes dados confirmam os apresentados por Moura & Romeiro (2000) que isolaram de rizoplano e rizosfera de plantas sadias de tomateiro, 196 actinomicetos que foram testados quanto à efetividade como agentes de biocontrole da murcha bacteriana do tomateiro, encontrando 26 actinomicetos mais promissores, os quais foram testados para promoção do crescimento. Os isolados (UFV-110, UFV-022 e UFV-129) que apresentaram efeito positivo de indução de crescimento também apresentaram atividade controladora de *R. solanacearum*. Trabalho semelhante foi realizado por Silva & Romeiro (2004).

Analisando o experimento 3, no sistema BK, a combinação UnB 1329 + UnB 1322 + UnB 1330 (pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Giesbergeria* sp., respectivamente) mostrou ser uma excelente combinação para o controle da bacteriose do tomateiro e um indutor de crescimento (cap. 2).

Com base nesses fatos, pode-se supor que a relação direta do crescimento das plantas e o controle biológico, realizada pelos isolados de bactérias extremófilas facultativas, pode estar envolvido com alguns mecanismos, que já foram descritos para as PGPR's, como a produção de fitohormônios, a mineralização de nutrientes, antagonismo, indução de resistência e outros, também verificados por Moura & Romeiro (2000).

O presente trabalho sugere mais pesquisas para compreender o modo de ação e o complexo processo do controle biológico realizado pelos isolados de bactérias extremófilas facultativas, na supressão da murcha bacteriana. Além disso, seria necessário mais conhecimentos para entender o comportamento de *R. solanacearum* e seus antagonistas, afim de se ter um melhor controle e erradicação da doença, em campos infestados.

## 5- CONCLUSÕES

No experimento individual, em ambos os sistemas orgânicos a testemunha têm mostrado maior incidência da doença em relação aos demais tratamentos, no entanto a incidência foi baixa quando comparada com experimento em combinação de três e com todos isolados simultaneamente. Os isolados UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) no sistema BK e UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) no sistema CO, mostraram ser eficientes na supressão da bacteriose, destacando-se com 100% de controle.

No experimento em combinação de três isolados e com todos aplicados simultaneamente, em ambos os sistemas orgânicos a testemunha apresentou alta incidência da doença. No sistema BK, a testemunha diferenciou significativamente de todos os tratamentos, inclusive da combinação UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) apresentando 87% e 27%, respectivamente, de plantas mortas. No sistema CO, houve alta percentagem da doença

em todos os tratamentos, no entanto nenhum tratamento diferenciou da testemunha que apresentou 60% de plantas mortas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Alfenas AC, Mafia RG, Sartório RC, Binoti DHB, Silva RR, Lau D, Vanetti CA (2006) *Ralstonia solanacearum* em viveiros clonais de eucaliptos no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 31:357-366.

Baker K (1987) Envolving concepts of biological control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 25:67-85.

Barreti PB, Souza RM, Pozza EA (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia** 32:731-739.

Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances** 16:729-770.

Bringel JMM, Takatsu A, Uesugi CH (2001) Colonização radicular de plantas por *Ralstonia solanacearum* biovars 1,2 e 3. **Scientia Agrícola** 58:497-500.

Botelho GR, Mendonça-Hagler LC (2006) Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops- an overview. **Brazilian Journal of Microbiology** 37:401-416.

Cardoso SC, Soares ACF, Brito AS, Laranjeira FF, Ledo, CAS, Santos AP (2006) Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and crotalaria to soil. **Summa Phytopathology** 32:27-36.

Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist** 157:503-523.

Cook RJ (1985) Biological control of plant pathogens: theory to application. **Phytopathology** 75:25-29.

Dianese JC, Takatsu A (1985) *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira** 10:362 (Resumo).

El-Abyad M, El-Sayed MA, El-Shanshoury AR, El-Sabagh SM (1993) Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. **Plant and Soil** 149:185-195.

Gava CAT, Pereira JC, Fernandes MC, Neves MCP (2002) Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37:1373-1380.

Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control** 29:66-72.

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahafee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** 43:895-914.

Hoitink HAJ, Fahy PC (1986) Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review Phytopathology** 24:93-114.

Hoitink HAJ, Boehm MJ (1999) Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. **Annual Reviews of Phytopathology** 37:427-446.

Höper H, Alabouvette C (1996) Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. **European Journal of Soil Biology** 32:41-58.

Janvier C, Villeneuve F, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Mateille T, Steinberg C (2007) Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology & Biochemistry** 39:1-23.

Kado CI, Heskett MG (1970) Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60:969-976.

Lopes CA, Santos JRM (1994) Doenças do Tomateiro. Brasília: EMBRAPA-CNPq: EMBRAPA-SPI. 61p.

Lopes CA, Quezado-Soares AM (2000) Doenças causadas por bactérias em tomate. In: Zambolim L, Vale FXR, Costa H (Eds.) **Controle de Doenças de Plantas- Hortaliças**. Volume 2. Viçosa MG. UFV. pp.757-799.

Melo IS (1998) Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo IS, Azevedo JL (Eds.) **Controle Biológico**. Jaguariúna- SP. Embrapa-CNPMA. pp.17-67.

Moura AB, Romeiro R, Neves MCP (1998) Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 33:2065-2072.

Moura AB, Romeiro RS (2000) Actinomicetos pré-selecionados para o controle de *Ralstonia solanacearum* com promotores de crescimento em tomateiro. **Revista Ceres** 47:613-626.

Pal KK, Gardener MB (2006) Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. Disponível: <http://www.apsnet.org/education/advancedplantpath/topics/biolcontrol/pdfs/PHI-BiologicalControl.pdf>. Acesso em 24/11/2009.

Ramesh R, Joshi AA, Ghanekar MP (2009) Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25:47-55.

Robbs CF, Cruz AP, Neto JR (1988) Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) em eucaliptos. Embrapa Jaguariúna, SP. **Comunicado Técnico** n°3.

Romeiro RS, Neves DMS, Halfeld VBA, Mizubuti ESG, Deuner CC (2000) Inadequação de uso de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico- um caso. **Phytopathologica** 26: 142. Abstract.

Romeiro RS (2007) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**: fundamentos. Viçosa MG. UFV.

Satoh K, Toyota K (2004) Comparison of disease suppressiveness of different soils with or without repeated application of organic matters toward bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environment** 19:310-314.

Silva HAS, Romeiro RS (2004) Isolamento e seleção massal de rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Ceres** 51:345-354.

Silva FAS (2009) Versão 7.5 do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. [http:// www.assistat.com](http://www.assistat.com). Acesso em 16/10/2009

Silveira EB (2001) Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: Michereff SJ, Barros R (Eds.) **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**- Recife: UFRPE. pp. 78-107.

Sun S, Wei AM, Wu HX, Wang J (2004) Advances in research on chemical and biological control of plant bacterial wilt. **Jiangxi Plant Protection** 27:157-162.

Sudo S, Oliveira GHN, Pereira AC (1983) Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e bracinga (*Mimosa scabrella* Penth), novos hospedeiros de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. **Fitopatologia Brasileira** 8:631 (Resumo)

Takatsu A, Lopes CA (1997) Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira** 15:170-177.

Uesugi CH, Tomita CK (2002) Murcha bacteriana. **Cultivar HF**. pp.12-14.

Vale FXR, Zambolim L, Zambolim EM, Alvarenga MAR (2004) Manejo Integrado das Doenças do Tomateiro: Epidemiologia e Controle. In: Alvarenga MAR (Ed.) **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras MG.UFLA.pp.213-308.

Vanitha SC, Niranjana SR, Mortensen CN, Umesha S (2009) Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Pseudomonas fluorescens*. **BioControl** 54:685-695.

Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse MJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Reviews Phytopathology** 36:453-483.

Xue QY, Chen Y, Li SM, Chen LF, Ding GC, Guo DW, Guo JH (2009) Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. **Biological Control** 48:252-258.

Zoccoli DM, Tomita CK, Uesugi CH (2009) Ocorrência de murcha bacteriana em helicônias e musácea ornamental no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology** 34:45-46.

Weller DM (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Reviews Phytopathology** 26:379-407.

Weller DM; Raaijmakers JM; Gardener MBB, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for species, soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 40:309-348.

Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 52:487-511.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal de *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology** 39:897-904.

Yuan WM, Crawford DL (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Applied and Environmental Microbiology** 61:3119-3128.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Em solos agrícolas é possível determinar diferentes grupos de bactérias que se adaptam as condições mais extremas de temperatura (bactérias termófilas), pH (bactérias acidófilas e alcalófilas) e salinidade (bactérias halófilas). Nestas amostras de solos, a maioria dos isolados obtidos foram representados por bactérias Gram negativas, e das Gram positivas não houve formadoras de esporos.

Os isolados enviados para identificação foram separados em três grupos distintos, com base nas reações positivas para as características bioquímicas: o primeiro grupo formado, com base no teste O/F, obteve-se sete isolados pertencendo a família Enterobacteriaceae, o segundo grupo com base no crescimento em meio King-B, dois isolados de *Pseudomonas* spp.; e o terceiro grupo não relacionados taxonomicamente com dois isolados, *Giesbergeria* sp. e *Chryseobacterium* sp.

No estudo da promoção do crescimento das plantas, no experimento com aplicação individual, em ambos os sistemas orgânicos, os isolados UnB 1327 (*Klebsiella* sp.) e UnB 1324 (*Enterobacter* sp.) mostraram ser eficientes agentes promotores do crescimento das plantas de tomate, avaliados em casa de vegetação. Ambos os isolados se destacaram com maiores incrementos na altura das plantas, peso da matéria fresca e seca, em relação à testemunha (não tratada).

Os experimentos em combinações de isolados mostraram que não tiveram efeitos significativos na altura, peso da matéria fresca e seca, em ambos os sistemas orgânicos, quando comparados com a aplicação individual que demonstrou melhores resultados.

No estudo da supressão de *Ralstonia solanacearum*, no experimento individual, em ambos os sistemas orgânicos a testemunha têm mostrado maior incidência da doença em relação aos demais tratamentos, no entanto a incidência foi baixa quando comparada com experimento em combinação de três e com todos isolados simultaneamente. Os isolados UnB 1321 (*Enterobacter* sp.) no sistema BK e UnB 1326 (*Klebsiella* sp.) e

UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) no sistema CO, mostraram ser eficientes na supressão da bacteriose, destacando-se com 100% de controle.

No experimento em combinação de três isolados e com todos aplicados simultaneamente, em ambos os sistemas orgânicos a testemunha apresentou alta incidência da doença. No sistema BK, a testemunha diferenciou significativamente de todos os tratamentos, inclusive da combinação UnB 1329 (*Pseudomonas* sp.) + UnB 1322 (*Enterobacter* sp.) + UnB 1330 (*Giesbergeria* sp.) apresentando 87% e 27%, respectivamente, de plantas mortas. No sistema CO, houve alta percentagem da doença em todos os tratamentos, no entanto nenhum tratamento diferenciou da testemunha que apresentou 60% de plantas mortas.

## ANEXO 1

---

**Tabela-** Composição e quantidades de matéria primas utilizadas para a produção de composto orgânico (compostagem) e composto bioativo (bokashi) (Tomita, 2001).

<b>Composto Orgânico (compostagem)</b>		<b>Bokashi</b>	
<b>Matéria prima</b>	<b>Quantidade (t)</b>	<b>Matéria prima</b>	<b>Quantidade (Kg)</b>
Bagaço de cana	10	Terra virgem	1.000
Terra de barranco	2	Composto	250
Farelo de arroz	2	Resíduos de leguminosas	250
Resíduos de leguminosas	2	Farelo da arroz	200
Farelo de mamona	1	Farinha de osso	100
Água	45% (v/v)	Cinza	100
		Farelo de mamona	50
		Rapadura	10
		Amido de milho	5
		Fubá	5
		Àgua	45% (v/v)

---



Sequenciamento do 16S dos isolados

**Isolado UnB 1326**

CGGTCCAAGACTCTACCGGGAGCAACCAAGTGGGAATATGCCACAATGGGCCAAGCCTGATGCCAGCCC  
ATCCCGTGTGTGAAGAAAAGCCTTTCGGTTGTAAAGCCGTTTCGCGGGGAGCGGGCGGTGATGTTTCTT  
AGCCTTCCGTGTGGTGTACGCGCCGACGAGGACGGTCTTTCCTCCGTTCCAGGAGGGGGGTAATATGG  
CGGGTGGGCTTTTAAATCGGCTTTTGTGGGCGTCGCGCGCTCGGGGGCGGTTTGTCAAGTCGTATGTGAT  
CTTTTCTGGCTGGGGTGGTCACTGCATTTGCCCTGGGGTGTGAGTGTGTATAGGGTGGTTCGATTT  
GCGGGTTTCTTGGTGGGTGCGTTGAGCTGTGTGGACTGCCGGTGGCGGGGGCGCCCCCTGGACAAAG  
ACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACG  
ATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGTTNAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA  
ATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCC  
TTCGGGAACTGTGAGACAGTGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGTAAGTTTGGGTTTAAAGTGCC  
GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAACGGCCGGGTAACCTCAAAGGAGACTGCCAG  
TG

**>Isolado UnB 1327**

CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAATACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGC  
AAGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGG  
GGTAACGGCTCACCTAGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGAC  
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT  
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATA  
ACCTTATCGATGACGTACCCGACAGAAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG  
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTGAAT  
CCCCGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC  
AGTTGTGGGGTGAAGCGTAGAGATCTGGAGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGGACAAAGACTG  
ACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGT  
CGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTA  
CGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTC  
GATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCG  
GGAACCTGTGAGACAGTGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGAGTTGTTGTGGTTTAAAGTCCC  
GACGCAACCCCTTATCCTTTGTTCCGACGCGGTTAGGCCGGGAACTCATAAGGAGACTGCCAGTGTAAA  
GCTGGAGGCAAGGTGTGCGGAGTGACNTCAAGTCATNCACTGGCCACTTACCGACCAAGGGCTACACACG  
TGCTAGCAATGGCATATACAAAAGAGAGAGTGACACTCGGCGAGACGCTAAGCGGACCTCATAAAGTAGTC  
GTCGTTAGTCCCGGATTCGGAGTCTGCTNACTGCGCACTTCCCTTATGAAGTC

**>Isolado UnB 1321**

CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGA  
GTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAATACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC  
GCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGT  
GGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAG  
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC  
ATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATTGNGGTTA  
ATAACCTCAGCGGATGACGTTACCCGACAGAAAGCACCAGGCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTG  
AAATCCCCGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTTAGAA  
TTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGCCAAGGCGGCCCTTGGACAAA  
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC  
GATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGG  
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT  
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGC  
CTTCCGGGAACTCTGAGACAGTGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTCGTGTGTTTGTGTTTGGGTTAAGTCCC  
GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGT  
AAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACA

ATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCTAGTCCGGATT  
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCGAC

**>Isolado UnB 1323**

CCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGA  
GTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTC  
GCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGT  
GGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC TGAG  
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC  
ATGCCGCTGTATGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATTGNTGGTT  
AATAACCATCAGTCGATTGACGTACCCGCGAGAAACCCGCTACTCAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTGT  
TACTGAGGGGCAAGCTTAATTGGAATTCGTGGTTCGTAAGCGCACGCAGGCGTTCTTCAAGTCGGTTGTTA  
AATCCCCGGGCTTTACCTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAGGCTAGATTCTTTTAAAGGGGGTAGAATTC  
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGCCAAGGCGGCCCTGGCAAAAG  
TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT  
GTCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAGTCGACCGCCTGGGGAG  
TACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT  
TCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTT  
CGGGAAGCTCTGAGACAGTGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGTAGTTGTTTTGGGTTAAGTCCCGCA  
ACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAAGCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAA  
CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCATATAATGCGTGATC

**>Isolado UnB 1330**

CTTTACACATGCAAGTCGAACGGTAAACAGCACTTCGGTGGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACA  
TCGGAACGTGCCTAGTAGTGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATGAGATCTAAGGATG  
AAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTTCGCTACTAGAGCGGCTGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAA  
AGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGTTGTGAGAGGCCGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  
CAGACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCG  
TGCAGGATGAAGCCCTTCGGGTTGTAACCTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCCCTCTTCTAATACAGGAG  
GTCATGCCGTTACCGTAAGGCTCAGCACCGGCAAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGC  
CAAGCGTTAATCGGGATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGGCGTTTTGTAAAGACAAGGGTGAATCCCC  
GGGCTCACCTGGGAAGTGCCTTTGTGACTGCAAGGCTAGATTACGGCAGAGGGGGTAGAATCCGCGT  
GTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAATCCCCGGGCTGTACTGAC  
GCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCA  
ACTGGTTGTTGGTTCTTAATTGACTCAGTAACGAAGCTAACCGCTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGTTGAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAAATTCGAT  
GCAACGCGAAAAACCTTACCACCTTTGACATGGCAGGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTCGAAAGA  
GAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTGTTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  
GAGCGCAACCCTTGCCATTAGTTGCTACGAAAGGCACCTCTAATGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  
AGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGGTAC  
AAAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCATAAAGCCAGTCTGATCCGGATCGCAGTCTGCAA  
CTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGGATCAGA

**>Isolado UnB 1324**

CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGC  
AAGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGGTCTTGCCGCTGCTGTGCCCGCTGGGATTGGCTAGTAGGTGG  
GGTAGTGGTACCTGAGGCGACGATCCCTAGGTGGTCTGAGAGGATGGCCAGCCACCGTGAAGCTGTGACA  
CGGTCCAGACTTCTACGGGAGGCAGCCGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG  
CCGCGTGTATGAAGAAGCCCTTCGGGTTGAAAGTGTATTTATCGGGAAGGAGTGGGGTTAATTTTGTG  
GGTTACTTGGCGTGTCTTCCAGGAAATGCACCGGCTAATTCGTGTGCCCGCACCGCTGTTTTACGGGG  
GGTGCAAGCTTTTATCGGAATTTGTGGGCTTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCGGGTGTGGAAT  
CCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTTGCAAGGCTAGAGTCTTTTAGAGGGGGTAGAATTC  
AGGTTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGACAAAGACT  
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG  
TCGACTTGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGT  
ACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT  
CGATGCAACGCGAAGAACCCTTACTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTC  
GGGAAGCTCTGAGACAGTGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTTTTTGTGTGTTGTTGGGTTAAGTCCCGCAA  
CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAAGCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAA  
CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG

GCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA  
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGATAGTAATCGTAGATCGG

**>Isolado UnB 1331**

CCTAACACATGCAAGCCGAGCGGTAGAGTTCCTTCGGGAACTTGAGAGCGGGCGCACGGGTGCGGAACACG  
TGTGCAACCTGCCTTTATTGGGGGATAGCCTTTCGAAAAGGAAGATTAATACCCATAATATACTGGATGG  
CATCATNCGGTATTGAAAACCTCCGGTGGATAGAGATGGGCACGCGCAAGATTAGATAGTTGGTGAGGTAA  
CGGCTCACCAAGTCCACGATCTTTAGGGGGCTGAGAGGGTGTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGA  
CCAGCCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATGTTGGACAATGGGTGAGAGCCTGGTCCAGCCATCCCGC  
GTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTTGTAACCTCTTTTGTATAGGGATAAACCTACTCTCGTGAGAGTAG  
GTGAAGTTCCTAATTCGGCTGTGCACCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA  
GCGTTATCCGGATTTAATGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGATCTGTAAGTCAGTGGTGAATCTCACAG  
CTTAAGTGTGAACTGCCATTGATACTGCAGGCTTGTAGTGTGTTGTAAGTAGCTGGAATAAGTAGTGTA  
GCGGTGGAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTAAGCAACAACATGACGCT  
GATGGACGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGCTAACT  
CGTTTTTTGGGTTTTTCGGATTTCAGAGACTAAGCGAAAAGTGATAAGTTAGCCACCTGGGGAGTACGAACGCA  
AGTTTGAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGATTATGTGGTTTAAATTCGATGATAC  
GCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGAAATGACAGGCTTAGAAATAGGCTTTTCTTCGGACATTTTT  
CAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACC  
CCTGTCACTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGGACTCTAGTGAGACTGCCACGCAAGTAGAGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAATCATCACGGCCCTTACGCCCTTGGGCCACACACGTAATAACAATGGCCGGTACAGAGG  
GCAGCTACACAGCGATGTGATGCAAATCTCGAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC  
TCTATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCG

**>Isolado UnB 1325**

CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGGCGGACGGGTGAGT  
AATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCCG  
AAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCCTCATGGCCTGGGCTTTGCCTCGATGGGATTGGCTGGTAGTTGG  
GGTCCCAGGCTACGTGGCGACGATCCCTAGTGGTTTGGAGGGATGCCAGCCACCTTGGAACTGAGACCCGT  
CCAGACTTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC  
GTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATACCTCA  
CCGATGACGTACCCTCAGCCGTTGCACCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCA  
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGG  
GCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATCCAGGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGGACAAGAGATGACGC  
TCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGAT  
TTGGAGGTTGTGCCCTTGGAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGC  
CGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATG  
CAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAA  
CTGTGAGACAGTGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGTTGTA

**>Isolado UnB 1328**

CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGGGCTTGCTCCTGGATTTCAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATG  
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGGGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCTGAGGG  
AGAAAGTGGGGGATCTTCGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA  
AAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGAGACACGG  
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG  
CGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGCGAGTAAGTTGATCCCTT  
GGTGTTTTTCGTTACCTTCGGGATAGGCATCGGCTGCGTTTTGTGCCCGGAGGCGGTGTTTTGCGCAGGGT  
GCGCGCGTTAGTGGGCATTCCTGGGGGTTAAGGGCGCGTCCGGTGGTTTCAGCAGTTGGATGTGGAATCCCC  
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCCAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAAGGGTGGTGGAAATTTCTGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACA  
CTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGG  
CCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA  
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACCTTTCCAGAGATGGATTGGTCCCTACGGGA  
ACTCAGACACAGTGTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTCGTTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCTTCCGAGG  
CGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGCACAAACCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGG  
TACAAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTG  
CAACTCGACTGCGTGAAGTCGAATCGACTAGTAATTCGTGATCAGA

**>Isolado UnB 1322**

CTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGGGGAGCTTGCTCCCCGGGTGACGAGCGGGCGGACGGGTGA  
GTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTC

GCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGT  
GGGGTAATGGCTCACGAGGCGACGNCCCTCGGTTGTGGAGAGGGATGGCCCGCCCCCTGGAAC'TGGAAC  
CCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGCAAGCCTGATGCAGCCAT  
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCAC'TTTCAGCGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA  
CGCTCATCAATTGACGTACCCTCCAGAGAGTACGCTGGCTAAGTCCGTGCCAGCGTCCGCGGTGATACGA  
GGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTTCTGGGCGTAACGCGCACGCCGGCGGTTTTTTAAGTCAGATGTGAA  
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGGAACTGGCAAGCTAGAT'TCTCTTAGAGGGGGGTAGAATT  
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAG  
ACTGACGCTCAGTTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACG  
ATGTCGATTTGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCCTGGGGA  
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA  
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCCT  
TCGGGAACTCTGAGACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAGTTGTTGGGTTAAGTCCCGC  
AACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATTA  
ACTGGAAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT  
GGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGG  
AGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGA

**>Isolado UnB 1329**

GCTCCTTGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTTCG  
AAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCCTATCAGAT  
GAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAC'TGGTCTGAG  
AGGATGATCAGTACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCCAGATCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  
GACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAACGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTT  
AAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCCTGTTTGGACCCTTACCGACAGAATAAGCACCGGGC  
TAAACTCTGTGCCAGCTAGCCGCGGTAATACAGAGGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA  
GCGCGCGTAGGTGGTTTCGCTTAAGTTGGATTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAA  
CTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGTGGTGGAAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAG  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAG  
TGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC'TCAAATGAATTGA  
CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC'TTACCAGGCCTTG  
ACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGTGTGTCATGGCTGTGCG  
TCAGCTCGT