

BIOPROSPECÇÃO DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*: IDENTIFICAÇÃO AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIAL DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS¹

Mateus Barbizan¹ Daniela Barbizan² Ms.Odair Antonio Barbizan ³ Dr. Nélío ⁴ Raniele Ferreira de Paula

Resumo

Com o objetivo de explorar as comunidades de microrganismos endofíticos de tomateiros visando à identificação e seleção de microrganismos com atividade antimicrobiana contra patógenos de interesse na indústria alimentícia e agrônomo, o presente projeto utilizou a metodologia de bioprospecção, que consiste em selecionar plantas que em meio à cultura infestada pelo patógeno *ralstonia solanacearum* que apresentam resistência à doença. Após os microrganismos serem isolados os mesmos foram utilizados em bioensaios com discos de difusão conforme procedimentos definidos por Huang et al. (2001). O resultado final consistiu na identificação e cultivo da *ralstonia solanacearum* em meio de cultura seletivo adaptado, e, com o teste de bio ensaio constatamos atividade antibiótica no solo isolado das plantas no entorno da plantação dos tomateiros.

Palavras-chave: bioprospecção, bioensaio, formação acadêmica.

Introdução

A procura e descoberta de um fenômeno biológico que possa ser explorado é o passo inicial em um projeto biotecnológico, no entanto tão crucial quanto qualquer outra etapa neste processo (Bull et al., 1992). A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do(s) melhor(es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções, e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (Bull et al, 2000). O objetivo principal do projeto foi explorar as comunidades de microrganismos endofíticos de tomateiros visando à identificação e seleção de microrganismos com atividade antimicrobiana contra o patógeno *ralstonia solanacearum* de interesse na indústria alimentícia, agrônomo e na formação acadêmica do profissional ligado a agricultura.

¹ Bolsista (PIBITI - IFRO), tccmateusbarbizan@gmail.com, Campus Colorado do Oeste.

² Bolsista (PIBIC EM - CNPq), bdaaniela@gmail.com, Campus Colorado do Oeste.

³ Orientador, odair.barbizan@ifro.edu.br, Campus Colorado do Oeste

⁴ Co-orientador(a), nelio.ferreira@ifro.edu.br, Campus Colorado do Oeste.

Material e Método

O material vegetal (tomateiros) foi coletado das estufas do assentamento conhecido como Agrovila de Vilhena/RO região de ocorrência das patologias causadas pela bactéria *Ralstonia solanacearum*. Em cada coleta foi obtido material de quatro plantas independentes distribuídas dentro da região de coleta. De cada planta foi retirada aleatoriamente amostras visivelmente infectadas. As amostras foram embaladas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Biologia onde ocorreu o isolamento dos microrganismos endofíticos no mesmo dia. Após a desinfecção das amostras vegetais para o isolamento de microrganismos endofíticos foi necessário que a superfície do material vegetal fosse desinfetada para retirada de microrganismos epifíticos e contaminantes. Os procedimentos de desinfecção do material vegetal e isolamento de microrganismos endofíticos foram realizados conforme descrito por Araújo e colaboradores (2000). Para desinfecção, as amostras sadias de tecidos vegetais sofreram uma série de lavagens sequenciais com etanol 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio 3% (3 minutos), etanol 70% (30 segundos) e duas vezes com água destilada esterilizada (6 minutos) (Araújo et. al., 2000). A eficiência da desinfecção do material vegetal foi avaliada pelo plaqueamento em meio ágar-batata-dextrose (BDA) e TSA de alíquotas da água utilizada na última lavagem do material vegetal e pelo pressionamento dos fragmentos desinfestados sobre o meio de cultura (Araújo et. al., 2000). Para o isolamento de bactérias endofíticas, 1 g das amostras vegetais desinfetadas superficialmente foram maceradas em 9 ml de solução salina (0.85%) estéril. A suspensão obtida foi diluída serialmente e alíquotas de 0.1 ml de cada diluição sendo plaqueadas em meio sólido TSA contendo 50 mg/ml do antifúngico benomil. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C por até 10 dias, sendo o crescimento dos microrganismos acompanhado diariamente. Após, as colônias crescidas nas placas foram contadas para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). A densidade da população de bactérias endofíticas foi estimada pelo peso fresco e pelo fator de diluição. As diferentes colônias crescidas foram repicadas e transferidas para meio TSA sem antifúngico para purificação do isolado. As bactérias isoladas foram armazenadas em meio sólido TSA inclinado a 4°C e em glicerol 30%. A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita pelo bioensaio de disco de difusão conforme procedimentos definidos por Huang et al. (2001). A suspensão (10⁵ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml) de células (ou esporos) de bactérias, leveduras ou fungos foi espalhada na superfície do meio de cultura BDA. Discos de papel estéreis (Whatman) foram impregnados com o caldo de fermentação e então, posicionados na superfície do meio de cultura inoculado. No controle negativo foi inoculado o meio de cultura e no controle positivo foi utilizado 30 µg/ml cloramfenicol para bactérias e 30 µg/ml cetoconazol para fungos e leveduras. As placas foram incubadas a 28°C por 2-5 dias. Após crescimento, a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição (em mm) ao redor do disco de papel.

Resultados e Discussão

Segundo a literatura consultada a tarefa mais complicada é separar as murchas bacteriana, de fusário e de verticílio. Neste caso a EMBRAPA, recomenda em seus trabalhos técnicos o procedimento do teste do copo. Este foi realizado cortando-se uma pequena porção (cerca de 5 cm) da parte mais inferior do caule de planta doente, colocou-se em seguida ligeiramente submersa em frasco transparente com água limpa (Figura I). A presença de um filete leitoso saindo do tecido em direção ao fundo do copo indica a presença da murcha-bacteriana. A complementação do diagnóstico foi realizada em laboratório: colônias típicas de *R. solanacearum* (Figuras II (A) e (B))



Figura 1 – Teste do copo, mostrando exsudação de pus bacteriano em caule de tomateiro afetado pela murcha bacteriana.

obtidas a partir da suspensão do exsudado leitoso e cultivado em meios de cultura diferencial de Kelman (1954).

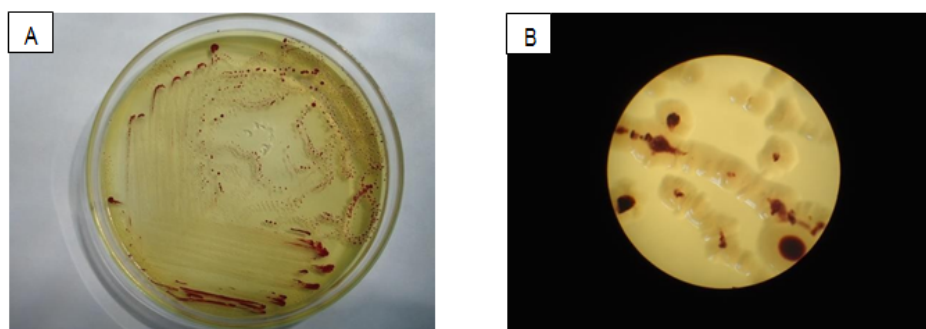


Figura 2 – (A) Colônias de *Ralstonia solanacearum* em meio de Kelman com tetrazólio. (B) aumento de 40x destacando o tetrazólio interagindo com o núcleo.

Após o isolamento, cultivo e identificação das bactérias através da reação com o tetrazólio, conforme protocolo da EMBRAPA, foi realizado o teste de inibição com o sobrenadante das lavagens efetuadas nas amostras. Conforme podemos perceber na figura III, houve inibição do crescimento das bactérias na área ao redor dos discos, indicando a presença de organismos ou substâncias inibidoras de crescimento no solo e raízes de plantas saudáveis coletadas nas estufas do Instituto Federal de Rondônia – IFRO.

Conclusões

Concluímos que o objetivo principal do projeto de explorar as comunidades de microrganismos endofíticos de tomateiros visando à identificação e seleção de microrganismos com atividade antimicrobiana contra o patógeno *Ralstonia Solanacearum* foi atingido, pois conseguimos identificar a presença da bactéria causadora da doença conhecida como murcha. Identificamos a presença de

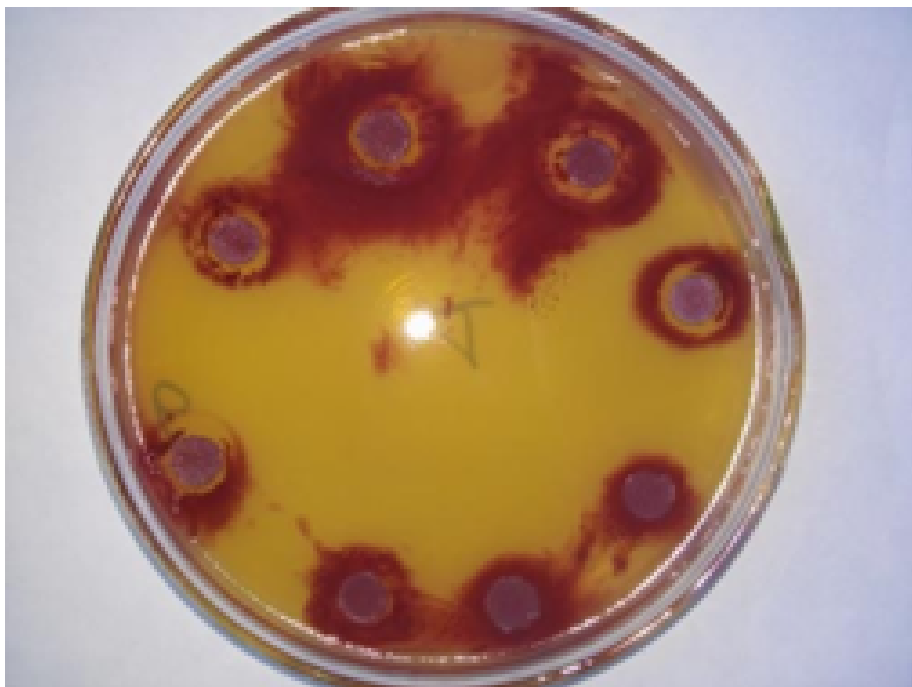


Figura 3 – Presença de halos de inibição, indicando presença de organismos/substâncias inibidoras de crescimento bacteriano.

organismos e ou substâncias com características inibidoras de crescimento bacteriano nos discos de inibição. Tornando-se o próximo passo para a continuidade do projeto com a possível identificação desta inibição

1 Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Professor Dr. Marcos Aurelio Anequine Macedo pela ajuda nas coletas, transporte e identificação das plantas utilizadas.

Instituição de Fomento

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia - IFRO que conta com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que fomentaram a realização da pesquisa, seja com concessão de auxílio(s) ou bolsa(s).

Referências

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V. SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.*, v.47, p.229-236, 2001. DOI: 10.1139/cjm-47-3-229. BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*, v. 46, p.219-252, 1992. BULL,

A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, p.573-606,2000. CRAWFORD, D. L., J. M. LYNCH, J. M. WHIPPS, AND M. A. OUSLEY. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p.3899-3905, 1993. GUNATILAKA, L.A.A. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p.509-526,2006. HUANG,Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 31, p.163-167, 2001. HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p.278-285,1998. PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLDANI, V.S.; LOPES, N.P. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p.45-61, 2002. QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L.; LI, W. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, p.457-473, 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-2923-6. SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabolismos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.&