



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**BACTÉRIAS DE SOLOS SUPRESSIVOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA SOBRE *Xanthomonas campestris* pv.
*campestris***

RAFAEL SALOMÃO DA SILVA

2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

RAFAEL SALOMÃO DA SILVA

**BACTÉRIAS DE SOLOS SUPRESSIVOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
SOBRE *Xanthomonas campestris pv. campestris***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora
Prof.^a Dr.^a Roberta Pereira Miranda Fernandes

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

X??x	Sobrenome, Nomes Título da dissertação/tese título da dissertação/tese título da dissertação/tese título da dissertação/tese título da dissertação/tese título da dissertação/tese / Nome completo. – São Cristóvão, 2014. XX f. : il. Dissertação/Tese (Mestrado/Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, 2014. Orientador: Prof. Dr. Nome completo 1. Palavra1 palavra1. 2. Palavra2 palavra2. 3. Palavra3 palavra3. 4. Palavra4 palavra4. I. Título. CDU: xxx.xxx.x
------	---

RAFAEL SALOMÃO DA SILVA

**BACTÉRIAS DE SOLOS SUPRESSIVOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
SOBRE *Xanthomonas campestris pv. campestris***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 28 de Fevereiro de 2016.

Prof^ª. Dr^ª. Francine Ferreira Padilha
Universidade Tiradentes (UNIT)

Dr^ª. Viviane Talamini
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Prof^ª. Dr^ª. Roberta Pereira Miranda Fernandes
Universidade Federal de Sergipe
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Ao Universo, por ter criado Deus. A Deus, por
ter criado a vida. A vida, por ter criado o ser
humano inteligível dotado da capacidade de
criar Deus.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter dado força de vontade, que determinou minha chegada até aqui, sem esta força, não estaria escrevendo este agradecimento. Aos familiares de uma maneira geral, em especial meu Pai, Jorge Luiz Menezes da Silva, minha mãe, Maria Helena Salomão da Silva, Minha mãe-avó, Dona Horcilla Menezes da Silva, Pai-Avô Moacyr Menezes Cardoso da Silva, meus irmãos e tios, pelo apoio que sempre me deram. A todos que fizeram parte desta singular passagem, aos professores, em especial a minha orientadora Professora Dra, Roberta Pereira Miranda Fernandes por palavras de sabedoria, paciência e dedicação, aos Professores e pesquisadores Dr(a)s: Marcelo Fernandes, Erica dos Anjos, Leandro Diniz , Ricador Scher, Cristiane Bani, Viviane Talamini, Francine Ferreira Padilha, Maria Urbana, Arie Blank e tantos outros por palavras de sabedoria, paciência e auxílio dado na construção do conhecimento. Aos amigos de Laboratório, Branda Moutinho, Caroline Gois, Isabela Vasconcelos e Mayara Mendes por me aturarem 24 horas, sem direito a reclamações (risos), UFS pelo suporte e auxílio e todas instituições que fizeram parte, dentro dos seus parâmetros no desenvolvimento da pesquisa. Enfim a todos que, de maneira geral, contribuíram para minha evolução e passagem. Grato!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. <i>Xanthomonas campestris</i> e podridão negra.....	15
2.2. Controle da Doença	16
2.3. Controle Biológico	18
2.3.1. O Solo como fonte de micro-organismo.....	18
2.3.2. O Solo supressivo	18
2.3.3. Perfil microbiano do solo supressivo.....	19
2.4. O gênero <i>Paenibacillus</i>	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
4. ARTIGO 1: ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS DO SOLO SOBRE <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS</i>	33
4.1. Introdução.....	34
4.2. Material e Métodos.....	35
4.2.1. Isolados bacterianos e condições de crescimento.....	35
4.2.2. Atividade antagonista	35
4.2.3. Preparado do filtrado extracelular bacteriano (FEB).....	36
4.2.4. Atividade antimicrobiana do filtrado extracelular bacteriano	36
4.2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana do FEB-TC-DT08, em diferentes tempos da curva de crescimento	36
4.2.6. Afiliação dos isolados.....	37
4.2.7. Concentração Inibitória Mínima (MIC)	37
4.2.8. Teste <i>in vivo</i>	37
4.3. Resultados	38
4.3.1. Atividade antagonista <i>in vitro</i> de bactérias contra <i>Xanthomonas campestris.pv campestris</i>	38
4.3.2. Atividade antimicrobiana do filtrado extracelular bacteriano	38
4.3.3. Avaliação do FEB e atividade antagonista em diferentes tempos de curva de crescimento.....	38
4.3.4. Identificação das bactérias com atividade antimicrobiana	38
4.3.5. Concentração Mínima Inibitória do FEB- <i>Paenibacillus</i>	38
4.3.6. Determinanação da atividade antimicrobiana <i>In vivo</i>	38
4.4. Discussão.....	39
4.5. Referencial Bibliográfico	41
FIGURAS	43
TABELAS	43
ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Taxa exibindo as correlações mais fortes representam organismos supostamente envolvidos na supressividade. Fonte: (JAMES et al , 2007).....	20
2. A estrutura do módulo de três Tipo I (Modular) PKS responsável pela síntese de eritromicina, com o crescimento da cadeia de policetidos. LD = módulo de carga, módulos M1-M6 e domínio TE = tioesterase. Fonte: (RUIZ et al, 2010).....	23
3. Antibióticos polimixinas A produzidos por <i>Paenibacillus</i> . Fonte: (Raza et al, 2008).	25
4. Antibióticos fusaricidina produzidos por <i>Paenibacillus</i> . Fonte: (Raza et al, 2008).....	25
n1. Atividade antimicrobiana dos filtrados bacterianos (FBE) sobre <i>X. Campestris</i> . Teste realizado em meio líquido. Controle positivo: Ampicilina (D12amp) na concentração de 12µg.µl-1.....	45
n2. Atividade antimicrobiana dos FEB- <i>Paenibacillus</i> , em diferentes dias, sobre Xcc 629 IBSB. Teste	46
n3. Frente do Limbo. Efeito do FEB (TC-DT08) sobre a capacidade Xcc 629 IBSB induzir sintomas de podridão Negra.(A) folha trata com Xcc 629 IBSB; (B) Folhas submetidas a tratamento com o FEB (TC-DT08) por um período de 24h; (C) Folhas não submetidas a qualquer tratamento; (D) Folhas tratadas somente com meio YM líquido, FEB (TC-DT08) e folhas tratadas com injeção de FEB (TC-DT08) em meio YM líquido.....	47

LISTA DE TABELAS

Figura	Página
1. Compostos antifúngicos e antibacterianos produzidos por diferentes estirpes de <i>Paenibacillus polymyxa</i> . Fonte: (RAZA <i>et al</i> , 2008).....	20
n2. Identificação de bactérias isoladas de solo supressivo a partir do sequenciamento parcial do gene 16 rRNA.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

YMA Yeast Malt Agar

YM Yeast Malt

TC-DT Tabuleiros Costeiros Deise e Thaís

FEB Filtrado Extracelular da Bactéria

PRSV-W *Papaya ringspot virus* - tipo W

ASM Acibenzolar-S-metil

MS Metabólitos Secundários .

PKS Policetídeo-sintases

PCR Reação em cadeia da Polimerase

MIC Concentração Inibitória Mínima

FEB-08 Filtrado extracelular bacteriano FEB de *Paenibacillus* de TC-DT08

ACB Agentes de Controle Biológico

RESUMO

SILVA, Rafael Salomão. **Bactérias de solos supressivos com atividade antimicrobiana sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. São Cristóvão: UFS, 2016. 43p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

Xanthomonas Campestris. pv *campestris* é uma bactéria fitopatogênica, agente causal da podridão negra em crucíferas. Dentre os mecanismos para o controle de doenças de fitopatógenos, destaca-se o uso de bactérias com atividade antagonista ao patógeno. Estudos recentes mostram que espécies de *Bacillus* exercem sobre *X. Campestris* um forte controle biológico. Um dos mecanismos deste controle é a produção de metabólitos secundários por essas espécies. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias antagonistas a *X. campestris* e avaliar a atividade antimicrobiana dos filtrados extracelulares das bactérias (FEB) com atividade antagonista. Para isso, 257 bactérias isoladas de solos supressivos foram avaliadas quanto a atividade antagonista *in vitro* pela técnica da dupla camada. Noventa e dois isolados (44,6%) foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno alvo (*X.campestris*). Dentre os 92 isolados selecionados no teste da dupla-camada, 51 (55,43%) apresentaram inibição do crescimento da *X. campestris* nos ensaios de inibição com os FEB em meio líquido. Treze destes inibiram 50% ou mais do crescimento do fitopatógeno-alvo, sendo que os FEB-08, FEB-31, FEB-68, FEB-74 e FEB-87 foram capazes de inibir 100% do crescimento de *Xanthomonas campestris*. O FEB do isolado TC-DT08, pertencente ao gênero *Paenibacillus*, foi utilizado para testes *in vivo* em plantas de couve-manteiga, em condições de casa de vegetação. A inoculação artificial de couve-manteiga com *X. campestris* pré-tratada com o FEB-8 demonstrou que a bactéria perde a habilidade de colonizar a couve e causar a podridão negra, o que indica o potencial do uso deste isolado para proteger a couve-manteiga da infecção por *X. campestris*.

Palavras-chave: Atividade antagonista, podridão negra, controle biológico, crucíferas.

* Orientadora: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora), UFS.

ABSTRACT

SILVA, Rafael Salomão. **Suppressive soil bacteria with antimicrobial activity against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. São Cristóvão: UFS, 2016. 4p. (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Xanthomonas campestris pv. *campestris* is a phytopathogenic bacterium, the causative agent of black rot in crucifers. For the control of plant pathogens diseases, there is the use of bacteria with activity antagonistic to the pathogen. Recent studies show that *Bacillus* species have on *X. campestris* a strong biological control. One of the mechanisms of this control is the production of secondary metabolites by these species. The objective of this work was to select bacteria *X. campestris* and antagonists to evaluate the antimicrobial activity of extracellular filtered bacteria (FEB) antagonist activity. To this, 257 bacteria isolated from a suppressive soil. They were evaluated in vitro antagonist activity by the technique of double layer. Ninety-two isolates (44.6%) were able to inhibit growth of the target pathogen (*X.campestris*). Of the 92 isolates selected on double layer of the test, 51 (55.43%) showed inhibition of growth of *X. campestris* on the inhibition assays with FEB in liquid medium. Thirteen of 50% or more inhibited the growth of the target pathogen, and the FEB-8, FEB-31-FEB 68, FEB 74-FEB-87 and were able to inhibit 100% growth of *X. campestris*. The FEB isolated TC-DT08, belonging to the genus *Paenibacillus*, it was used for in vivo tests in plant farming kale. The artificial inoculation kale with *X. campestris* pretreated with FEB-08 showed that the bacterium loses the ability to colonize and cause the cabbage black rot, indicating the potential use of this isolate to protect kale butter infection by *X. campestris*.

Key-words: antagonist activity, black rot, biocontrol, cruciferous.

* Supervising: Roberta Pereira Miranda Fernandes – UFS (Orientadora), UFS

1. INTRODUÇÃO GERAL

A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é uma bactéria fitopatogênica pertencentes ao filo *Proteobactéria*. Essa bactéria possui características importantes, como por exemplo, a produção de um pigmento amarelo denominado xantomonadinas (STARR,1964; MORRONI, 2013). Este fitopatógeno é o agente casual da podridão negra. Uma doença que causa sérios prejuízos a planta hospedeira, a exemplo das *Brássicas* pertencentes a família *Brassicaceae* (ANDRADE *et al*, 2005).

Em geral, essa bactéria causa danos ao tecido foliar da planta hospedeira, afetando folhas, nervura e limbo. Alguns destes sintomas são característicos, como a presença de lesões em forma de “V”; escurecimento de nervuras, nicro vasos no pecíolo e caule resultando na murcha e necrose dos tecidos foliares (MORRONI *et al*, 2013).

Em se tratando de controle desta doença, algumas estratégias são usadas como, por exemplo, o cultivo de variedades das plantas resistentes a podridão negra ou controle de insetos vetores e ervas daninhas e distribuição de plantas infectadas, bem como o emprego de sementes sadia. (TEBALDI *et al*, 2007).

Tradicionalmente, o controle químico da podridão negra tem sido feito com a utilização de produtos químicos à base de cobre, misturas cuprocarbonatos e antibióticos, como por exemplo, o antibiótico Oxitetraciclina, isolado a partir de actinomicetos *Streptomyces rimosu*, ou Oxicloreto de cobre, piraclostrobina, Acibenzolar-S-metil, entre outros. No entanto, com o uso indiscriminado desses produtos pelos agricultores, populações de bactérias resistentes podem surgir, contribuindo para a ineficiência dos produtos desses produtos (AGUIAR *el al*, 2000).

Uma estratégia utilizada, na redução do controle químico, tem sido à descoberta de micro-organismos, de solo supressivo. Os micro-organismos deste solo possuem um histórico natural de antagonismo contra uma ampla diversidade de fitopatógenos habitantes do solo, incluindo fungos, bactérias e nematoídes. Esses micro-organismos controlam podridões radiculares e muchas causadas por: *Aphanomyces euteiches* Drechsler, *Cylindrocladium* sp., várias espécies de *Funsarium.oxysporum*, *Ralstonia solani*, *Gaeumannomyces graminis*(Sacc.) *R. solanacearum*, *F.oxysporum*, *R.solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Xhantomonas camprestirs* dentre outros (BETTIOL, 2009; KINKEL, 2011; MORRONI, 2013).

Várias espécies de bactérias são relacionada à supressividade do solo como, por exemplo, as Actinobactéria, os *Streptomycetos* e as *Paenibacillus* no entanto, as espécies

dentro do gênero *Bacillus* e gênero *Pseudomonas* são as que se destacam, provavelmente devido a maior ocorrência neste tipo de solo (RAAIJMARKES *et al*, 2012).

As atividades antagonistas destas bactérias, sobre fungos e outros patógenos, são associadas à produção de moléculas denominadas Metabólitos Secundários (MS) (RAAIJMARKES *et al*, 2012). Os MS são compostos sintetizados na fase estacionária de crescimento do micro-organismo e geralmente são produtos de excreção. Essas moléculas vêm sendo utilizadas para diversos fins, tais como antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de respostas imunológicas e promotores de crescimento de animais e plantas (STEIN, 2005; SANSINENEA, 2011).

Assim, devido ao interesse na busca por novos micro-organismos, principalmente isolados bacterianos de solo supressivo com capacidade antagonista contra micro-organismos fitopatogênico, esse estudo teve como principal objetivo selecionar isolados bacterianos, de solo supressivo, com alta atividade antimicrobiana contra *X.campestris*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Xanthomonas campestris* e podridão negra

A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é uma bactéria fitopatogênica pertencente ao filo *Proteobactéria*. Possuem características importantes, como por exemplo, a produção de um pigmento amarelo denominado xantomonadinas (STARR, 1964; MORRONI, 2013). Morfologicamente apresentam aspecto celular do tipo bastonete, com tamanho médio entre 0,4-0,7 x 0,7-1,6 µm. São bactérias Gram-negativas, aeróbias estritas, com crescimento liso, circular e mucóide em meio de cultura (ANDRADE *et al*, 2005).

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é o agente casual da podridão negra, uma doença que causa sérios prejuízos as plantas, especialmente as *Brássicas* pertencentes a família *Brassicaceae* (ANDRADE *et al*, 2005). No Brasil, Xcc é um dos patógenos bacterianos com o maior número de hospedeiros e ampla distribuição territorial (CÂNDIDO, 2007).

Algumas plantas hospedeiras de Xcc podem ser relatadas no Brasil e local de ocorrência. A exemplo da planta hospedeira *Brassica oleraceavar.botrytis* (Couver-flor), presente nos Estados de AM, DF, GO, PE, PR, RS, *Brassica oleraceavar.capitata* (Repolho), ou *Brassica rapa var.pekinensis* (Repolho chinês) presentes em toda território, ou ainda *Brassica oleraceavar.acephala* (Couve), presente nos Estados de AM, AP, BR, DF, GO, PE, PR, RS, SE, entre outras espécies em diferentes regiões (MALAVOLTA Jr *et al*, 2008).

Em geral, a Xcc causa danos ao tecido foliar da planta hospedeira, afetando folhas, nervura e limbo. Alguns destes sintomas são característicos, como a presença de lesões em forma de “V”; escurecimento de nervuras, microvasos no pecíolo e caule resultando na murcha e necrose dos tecidos foliares (MONTEIRO *et al*, 2005). Alguns sintomas atípicos incluem lesões amareladas ou marrons sem o formato de “V” mas com aspecto arredondado e ausência de escurecimento de nervuras (MORRONI *et al*, 2013).

Muitos destes sintomas são explicados pela característica sistêmica da bactéria. Ao se estabelecer nos feixes vasculares, as bactérias retiram nutrientes da nervura o que podem causar hiperplasia e hipertrofia na região do inóculo, que são frequentemente rodeadas por um halo cloróticas (VELASCO *et al*, 2013). Na tentativa de conter a infecção sistêmica, a planta hospedeira acumula fibras no seu interior causando entupimento dos vasos, levando à deficiência de água, murcha e necrose dos tecidos foliares ao redor das nervuras infectadas. Com o progresso da doença, pode haver queda prematura das folhas (SANJU *et al*, 2014).

2.2. Controle da Doença

A indústria de biocontrole cresceu consideravelmente ao longo de 19 anos (5,3 vezes mais rápido que a indústrias de defensivos químico) (HOMEM, 2013). No Brasil, diversos destes produtos biológicos estão disponíveis para utilização sendo 295 produtos comerciais registrados, de acordo com dados da ABCBIO (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico). Dos 259 destes produtos, até a presente data (05/05/2016), 145 (55,98%) são pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo os a base de fungos, outras bactérias e vírus, além de ferormônios, parasitas, predadores e parasitóides (ABCBIO,2016). Dentre os Estados com maior número de registros São Paulo se destaca. Na região Nordeste, poucos estados são detedores de patentes para os produtos biológicos, a exemplo da Bahia, Alagoas, Pernambuco e Ceará. O estado de Sergipe não possui registro de produtos Biológicos, de acordo com ABCBIO.

Dentre estes produtos registrados podem ser citados: estirpes fracas de *Papaya ringspot virus* - tipo W (PRSV-W) para imunização contra o mosaico da abobrinha; *Hansfordia pulbinata* para o controle do mal-das-folhas da segingueira; *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro; *Clonostachys rosea* para o controle do mofo cinzento; *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças tais como podridão negra em brassicas, broca do colmo de milho, causadas por lagartas,; *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos de solo e substrato e da parte aérea (MORANDI, 2009). No entanto, ainda é incipiente no mercado a disponibilidade e uso de produtos para tratamento de doenças causadas por bactérias fitopatogênicas.

Em se tratando de doenças fitopatogênicas, causadas por bactérias, a mais importante medida de controle é a preservação da contaminação da cultura pelo uso de material propagativo sadio e de boa qualidade (TEBALDI *et al*, 2007). Algumas outras práticas de controle consistem em: retirada e destruição de plantas inteiras ou parte delas, assim como a limpeza e desinfestação de ferramenta, bancadas, vasos durante o plantio (MAZID; KHAN, 2014).

Com relação aos métodos químicos, são utilizados com ação bactericida e antibióticos de uso agrícola. Os fungicidas mais comumente empregados são os cúpricos (calda borbalesa, sulfato de cobre, oxiclreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso) e os carbonatos (MAZID; KHAN, 2014). Com relação aos antibióticos, existem 4 produtos comerciais, à base de oxitetraciclina, estreptomicina ou kasugamicina, registrados para uso agrícola contra podridão negra por Xcc (MAPA,2016).

Atualmente, além dos cúpricos, apenas os princípios ativos acibenzolar-S-metil (ASM) e cloretos de benzalcônio, possuem registro para o (MAPA,2016) com indicação para o controle da podridão negra. O ASM é um indutor da resistência da própria planta, e os cloretos de benzalcônio são amônias quaternárias que agem por contato e induzem resistência localizada (MAZID; KHAN , 2014).

Algumas estratégias são usadas para o controle do fitopatógeno *Xanthomonas*, entre as mais importantes pode-se citar o cultivo de variedades das plantas resistentes a podridão negra, controle de insetos vetores e ervas daninhas e distribuição de plantas infectadas, bem como o emprego de sementes sadias (TEBALDI *et al.*, 2007). No entanto, com o uso indiscriminado desses produtos pelos agricultores, populações de bactérias resistentes podem surgir, contribuindo para a ineficiência desses produtos (MAZID; KHAN, 2014).

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a atividade antimicrobiana de produtos naturais para o tratamento da podridão negra. Silva e colaboradores (2013) demonstraram a atividade antimicrobiana de moléculas da classe galatos de alquilo na prevenção e redução de sintomas causados por *Xanthomonas citri subsp. citri* em citros (Laranja). Estes compostos possuem importantes atividades bactericidas, o que diminui a viabilidade celular de células tratadas (AGGANI, 2013). Outros estudos reportam a atividade de vários *Bacillus* (*B. Subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210) sobre *X. campestris*, sendo estas responsáveis pela inibição do crescimento das linhagens da *Xanthomonas. Campestris* pv. *campestris* (MONTEIRO *et al*, 2005). Silva (2014) mostraram que dentre as 257 bacterias isoladas de solo supressivos, 84 apresentaram-se bioativas contra *Thielaviopsis paradoxa*, *Plenodomus destruens* e *Xanthomonas. Campestris* pv. *campestris*.

Essa atividades têm sido associadas a produção de metabólitos secundários (MS) por *Bacillus*. Os MS produzidos por estes micro-organismos representam um repertório rico em diversidade química e molecular, além de serem promissores em estudos biotecnológicos, em especial, como produção de antibióticos (KHUSRO *et al* 2013). Assim, o estudo das populações bacterianas torna-se uma importante fonte de investigação de novos compostos fitopatogênicos, visto que esses micro-organismos se destacam pela possibilidade de sintetizar substâncias como: vitamina, inibidor de atividade enzimática e antibióticos e possibilitam uma fonte de tratamentos alternativos para controle da podridão negra (CREVELIN *et al*, 2013).

2.3. Controle Biológico

2.3.1. O Solo como fonte de micro-organismo

Quando se trata de meio ambiente, é impossível dissociar os ambientes terrestres do solo e dos micro-organismos que nele habitam. Estes micro-organismos estão presentes em toda parte do solo, seja na rizosfera, superfície das partículas do solo e microporos ou até mesmo em micro-agregados de solo (ANDRADE; NOGUEIRA, 2005).

Muitos destes locais possuem uma grande diversidade de micro-organismos, nos quais exercem diferentes papéis no ambiente ou micro-ambiente (OLSEN *et al*, 2012). O papel da microbiota do solo é extenso, a exemplo da fixação de nitrogênio por bactérias nitrificantes, ou a participação nos ciclos biogeoquímicos. Certamente não há como descrever o papel de todos eles, contudo sabe-se que muitos destes são transformadores químicos, físicos e biológicos do solo (WELLER, 2002; OLSEN, 2012).

Com relação a transformações biológicas, muitos destes micro-organismos desempenham um papel importante no controle natural de doenças de solo (controle biológico), em plantas terrestres. Esses micro-organismos são principalmente fungos e bactérias (NEERGAARD, 2015).

As bactérias são importantes micro-organismos que se destacam quando à capacidade de inibir outras bactérias e fungos fitopatógenos. Essa ação é devida principalmente à produção de antibióticos (KINKEL *et al*; KUMAR *et al*, 2012). Contudo, trabalhos sobre bactérias oriundas de solos supressivos são escassos e os mecanismos responsáveis pela supressividade não são plenamente esclarecidos. Assim, torna-se importante estudar estes micro-organismos, principalmente os relacionados com a supressividade (KUMAR, *et al* 2012).

2.3.2. O Solo supressivo

Solos supressivos possuem a capacidade de prevenir naturalmente o estabelecimento de patógenos no solo e assim diminuir a severidade das doenças que esses causam nas plantas (BETTIOL *et al*, 2009; PENTON *et al*, 2014).

Vários fatores estão envolvidos direta e indiretamente na indução da supressividade, tais como textura e tipos de argila, níveis de macro e micronutrientes, relação C/N, condutividade

elétrica e pH do solo, grau de compactação do solo, densidade, biomassa, atividade e diversidade microbiana do solo (MOREIRA *et al*, 2013). Estas propriedades atuam acelerando ou retardando o desenvolvimento das doenças fitopatogênicas. (GHINI, 2001; BETTIO, 2009). Outros fatores podem levar a supressividade, como por exemplo, a produção de compostos antimicrobianos produzidos por micro-organismos, além de compostos como sideróforos e enzimas extracelulares com propriedades antagonistas a patógenos (KUMAR *et al* 2012).

No entanto, interações complexas entre esses fatores podem dificultar a constatação de indicadores responsáveis pela supressividade. Visando à utilização dessa informação no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças (BETTIOL, 2009; PENTON, 2014).

Em contraste as dificuldades encontradas na identificação das propriedades e mecanismos que levam à supressão a maioria dos solos supressivos mantem sua atividade quando trazidos para o laboratório, o que facilita a avaliação sob condições mais controladas e reproduzíveis. Assim, estudos *in vitro* tem permitido analisar de forma mais detalhada os fatores, sejam eles diretos ou indiretos, que levam a supressão (ANDRIÓN, 2009; GHINI *et al*, 2001).

Trabalhos neste sentido, tem isolado com sucesso, micro-organismos relacionado a supressão, dentre os quais as bactérias se destacam. Outros micro-organismos também podem ser citados, a exemplo de fungos e organismos pertencente aos invertebrados, como os nematóides (KINKEL,2011). Os micro-organismos e organismos relacionados com a supressividade agem por meio de mecanismos envolvidos tais como; antibiose ou amensalismo, parasitismo, competição, predação e indução de resistência do hospedeiro (BETTIOL, 2009).

A antibiose é um importante parâmetro, em comparação aos demais mecanismos, já que a antibiose, mediada pela produção de metabólitos é o principal mecanismo de antagonismo apresentado muitos micro-organismos (JAMES e OLE, 2007).

Dessa forma, na busca por novos antibióticos, os solos supressivos tornam-se relevantes, pois suas características possibilitam à descoberta de micro-organismos com um histórico natural de antagonismo e propensos a produção de moléculas com atividade antimicrobiana (BETTIOL, 2009; KINKEL, 2011; MOREIRA, 2013).

2.3.3. Perfil microbiano do solo supressivo

Vários espécies de bactérias são relacionadas a supressividade do solo como, por exemplo, as Actinobactérias, *Streptomyces* e *Paenibacillus*. No entanto, espécies dentro do

gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* são as que se destacam, provavelmente devido a maior ocorrência neste tipo de solo (RAAIJMARKES *et al*, 2012).

Amostras de solo coletadas em áreas da região agreste do Estado de Pernambuco são supressivas à murcha do fusarium do tomateiro. Este fenômeno foi atribuído à elevação dos níveis populacionais de antagonistas específicos a doença (MACHADO; BORRET, 2004).

Andrión (2009) observou que a diminuição da atividade (ou do número) dos microorganismos resultou no aumento da severidade da rizoctoniose em solos supressivos. Este fato pode está relacionado à abundância relativa dos diferentes grupos taxonômicos de microorganismos que foram associados aos diferentes níveis de supressividade (JAMES *et al* 2007) (figura1).

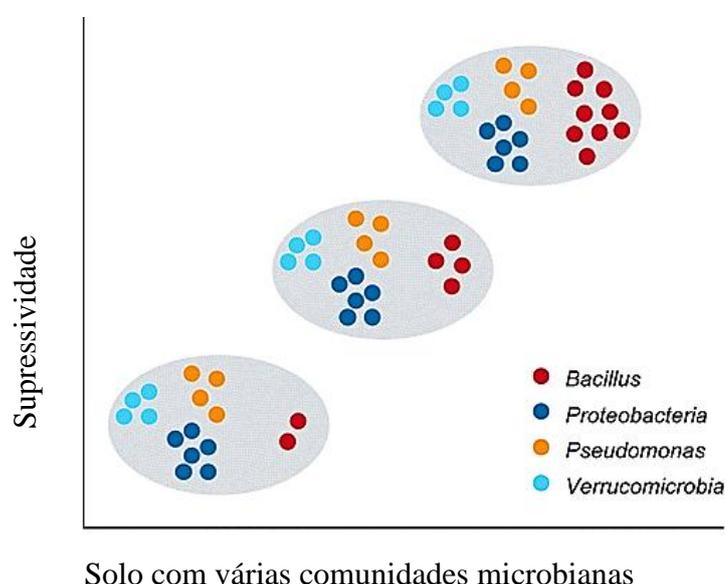


FIGURA 1. Taxa exibindo as correlações mais fortes representam organismos supostamente envolvidos na supressividade. Fonte: (JAMES *et al* , 2007).

A figura 1 mostra a distribuição da comunidade microbiana em três solos com diferentes níveis de supressividade. Com exceção de *Bacillus* as densidades populacionais de todos os táxons são os mesmos em cada solo. As densidades populacionais de *Bacillus* correlacionaram-se positivamente com os níveis de supressividade, sugerindo que ele pode estar envolvido neste processo, e que seria, por tanto, um bom candidato para um estudo mais aprofundado (KUMAR *et al*, 2012). Corroborando esse estudo, Maughan e colaboradores (2011), demonstrou que a presença de *Bacillus* foi maior na rizosfera de um solo supressivo quando comparado ao condutivo, confirmando assim a importância de espécies do gênero *Bacillus* envolvidas na supressividade.

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) compreende um conjunto diverso de bactérias gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e que possuem propriedades únicas como, por exemplo, a formação de endósporos (MAUGHAN *et al*, 2011). Os endósporos são estruturas termo tolerantes resistentes a altas temperaturas, radiação ultravioleta e a solventes orgânicos (SLEPECKY *et al*, 2006). Esta capacidade de esporulação permite aos *Bacillus* sobreviver aos mais diferentes ambientes, incluindo plantas, superfícies de rios, lagos, manguezais, oceanos, fontes hidrotermais e ambientes extremos. Contudo, apesar de amplamente distribuído, são onipresentes em solos (HAMDACHE *et at*, 2013).

Este gênero se destaca quando à capacidade de inibir uma ampla variedade de micro-organismos, sendo muito utilizado no biocontrole de fitopatógenos, que causam diversas doenças tais como: tombamentos de plântulas, podridões do colo e raízes, murchas vasculares e galhas e a podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (MONTEIR, 2005; MORRONI, 2013).

Dada a importância como biocontrole deste gênero, trabalhos têm sido realizados no intuito de isolar novas bactérias com amplo espectro de ação no biocontrole e identificar compostos bioativos produzidos pelas mesmas.

As atividades antagonistas de *Bacillus* sobre fungos e outras bactérias, é associada à produção de moléculas denominadas Metabólitos Secundários (MS). Os MS são compostos sintetizados na fase estacionária de crescimento do micro-organismo e geralmente são produtos de excreção (RAAIJMARKES *et al*, 2012). Os MS possuem estruturas químicas variadas, e são usados em diversos setores tais como: agricultura, farmacologia, medicina (SANSINENEA e ORTIZ, 2011). Essas moléculas vêm sendo utilizadas para diversos fins, tais como antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de respostas imunológicas, feromônios e promotores de crescimento de animais e plantas (STEIN, 2005).

Os MS são sintetizados por vias biossintéticas formadas por diversas enzimas livres ou por sistemas enzimáticos multifuncionais. Mais de 23.000 MS já foram relatados e cerca de 150 são usados na agricultura, farmacologia, ou outras áreas (CREVELIN *et al*, 2013).

A produção de MS com propriedades antibióticas é uma característica comum a *Bacillus*. Muitos dos MS produzidos por *Bacillus* são dipeptídeos ou peptídeos cíclicos com baixo peso molecular. Formados por estruturas altamente rígidas, hidrófobas, geralmente são resistentes à hidrólise por proteases e peptidases (SANSINENEA, ORTIZ, 2011). Estes compostos são agrupados de acordo com sua massa molecular, estrutura secundária e terciária, ausência ou presença de pontes de dissulfeto (RAAIJMARKES *et al*, 2012).

A biossíntese de peptídeos por *Bacillus* ocorre por duas vias, às conhecidas como ribossomais – produto da expressão gênica- e não ribossomais – sintetizados por enzimas multifuncionais denominadas peptídeo sintetase não ribossomal que utilizam aminoácidos não protéicos, hidroxiácidos e substâncias policetílicas para a síntese. O produto final formado pelas esta via passam por modificações pós-síntese (SANSINENEA, ORTIZ, 2011).

Os MS formados por vias ribossomais são representados pela família dos lantibióticos. Neste grupo estão moléculas como subtilina, ericina, mersacidina, sublancina e subtilosina. Os antibióticos de síntese não-ribossomal são classificados por lipopeptídeos bioativos.

Os Antibióticos lipoprotéicos não-ribossomais são moléculas anfipáticas geradas pela condensação dos ácidos graxos β -hidroxila ou β -amino. Variações no comprimento e ramificação das cadeias de ácidos graxos, assim como substituições de aminoácidos levam a micro-heterogeneidade notável destes moléculas. A surfactina 2, por exemplo é um antibiótico não-ribossomal que exerce uma ação detergente, como também atividades anti-virais e anti-micoplasma (ELOY; JÚNIO, 2012).

Outra importante família de lipopeptídeos são as inturinas. Essas moléculas são conhecidas, principalmente por sua atividade antimicrobiana sobre a membrana citoplasmática da célula alvo alterando sua permeabilidade, resultando em morte celular (PATHAK *et al*, 2013).

Além destas classes, os MS formados por policetídeos apresentam uma das maiores diversidades estruturais, entre os produtos naturais, sendo muitos desses ativos em diversos sistemas biológicos. Os policetídeos são metabolitos secundários de bactérias, fungos, plantas e animais, são normalmente biossintetizados através da condensação de unidades de acetila ou malonila por enzimas especializadas, as policetídeo-sintases (PKS) (PASTRE *et al*, 2007).

As PKSs são estruturalmente e funcionalmente relacionadas com a síntese de ácidos graxos, sendo assim, tanto para a produção de ácidos graxos como policetídeos (PERES, 2004) A policetídeo-sintase tem sido categorizada com base no número de subunidades (um ou mais) e modo de síntese linha (AR e iterativo). Onze domínios diferentes são reconhecidos pela PKSs.

O domínio responsável pela adição de uma única unidade de cetideos ao policetídeos em crescimento é chamado de módulo (Figura 2) (RAAIJMARKES *et al*, 2012).

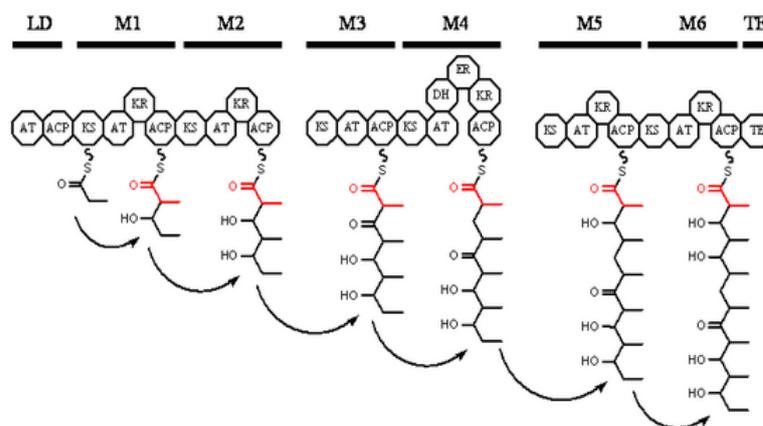


FIGURA 2. A estrutura do módulo de três Tipo I (Modular) PKS responsável pela síntese de eritromicina, com o crescimento da cadeia de policetídeos. LD = módulo de carga, módulos M1-M6 e domínio TE = tioesterase. Fonte: (RUIZ *et al*, 2010).

Estruturalmente, trata-se de um grupo muito diverso de produtos naturais, com diversas atividades biológicas e farmacológicas. De modo geral, dividem-se em três classes: Policetídeos tipo I (macrólitos), tipo II (moléculas aromáticas produzidas pela ação iterativa de enzimas dissociadoras), e tipo III (pequenas moléculas aromáticas produzidas por espécie de fungos) (PATHAK *et al*, 2013).

Muitos destes antibióticos são produzidos por diferentes espécies de *Bacillus*. Leifert (2005) estudaram duas espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* CL27 e *B. pumilus* CL45, e relataram que a atividade exercida *in vivo* contra *Botrytis cinerea* pelo *B. subtilis* CL27 era devida à produção de MS peptídicos, pois mutantes dessa espécie, incapazes de produzir o antibiótico, deixavam de apresentar atividade contra esse patógeno. De forma semelhante, Pichard e colaboradores (2005) relataram que a atividade *in vitro* contra *X. campestris pv. campestris*, apresentada por *B. polymyxa*, era devida a produção e inibição de dois antibióticos: a gavaserina e satavalina.

2.4.O gênero *Paenibacillus*

O gênero *Paenibacillus* é formado por oitenta e nove espécies (2016). As espécies deste gênero são aeróbias facultativas, formadoras de endosporos e gram-positivas. Apresentam-se

em forma de bastonetes, organismos móveis, possuem flagelos peritriquios e não possuem pigmentos (RAZA; HEN, 2008).

As espécies deste gênero são formadas por micro-organismos de vida livre presente na maioria dos solos assim como água, raízes de árvores, alimentos, forragem, fezes e larvas de insetos (HELBIG, 2001). São importante fonte de nitrogênio para as plantas, além disso influenciam o crescimento e defesa de plantas através da produção de fitormônios, quitinases, proteases e antibióticos (RAZA; HEN, 2008).

Membros deste gênero podem ser antagonistas a diferentes micro-organismos patogênicos. Dentre as variedades de espécies pertencente a esse gênero, pode citar os isolados de *Paenibacillus polymyxa* que são capazes de suprimir várias doenças de plantas, sendo usado com sucesso no controle biológicos contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium sp.*, *Xanthomonas campestris*, entre outras (MAGESHWARAN *et al*, 2011). O gênero *Paenibacillus* é conhecido por sua capacidade de produzir uma ampla variedade de antibióticos, alguns dos quais não estão bem caracterizados (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos antifúngicos e antibacterianos produzidos por diferentes estirpes de *Paenibacillus polymyxa*. Fonte: (RAZA *et al*, 2008).

Nome	Peso Molecular (Da)
Bacteriocina	3864
Fusaricidina A	883
Fusaricidina B	897
Fusaricidina C	947
Fusaricidina D	961
Gatavalina	> 3500
Gavaserina	911
Jolipeptina	-
LI-F03	961,947
LI-F04	897,883
LI-F05	911,897
LI-F07	945,911
LI-F08	925,911
PolimixinaA	-
Polimixina B ₁	1202.48
Polimixina B ₂	1184.7
Polimixina C	-
Polimixina D	1144.37
Polimixina E ₁ (Colistina A)	1169.46
Polimixina E ₂ (ColistinaB)	1155.43
Polimixina M	1157.47
Polimixina S ₁	1178.38
Polimixina T ₁	1215.58
Polimixina A	1115.41
Saltavalina	10,000
Saltavalina	903

Os principais antibióticos peptídicos produzidos por isolados de *P. polymyxa* é a polimixina pertencente à família das colistinas. Outros peptídeos, incluindo polipeptinas, jolipeptina, gatavalina, gavaserina, saltavidina e fusaricidina também são produzidos por isolados de *P. polymyxa*. Além dos peptídeos isolados de *P. polymyxa* produzem bacteriocinas (HELBIG, 2001; RAZA, 2008; MAGESHWARAN *et al*, 2011).

As polimixinas foram descritas pela primeira vez em 1947 e, desde então, têm sido extensivamente estudadas. A estrutura geral de polimixinas inclui uma porção de heptapeptídico cíclico ligado a uma cadeia lateral de tripeptídeo com os resíduos de acil em que o grupo amino N-terminal (figura 3) (DIJKSTERHUIS *et al*, 1999).

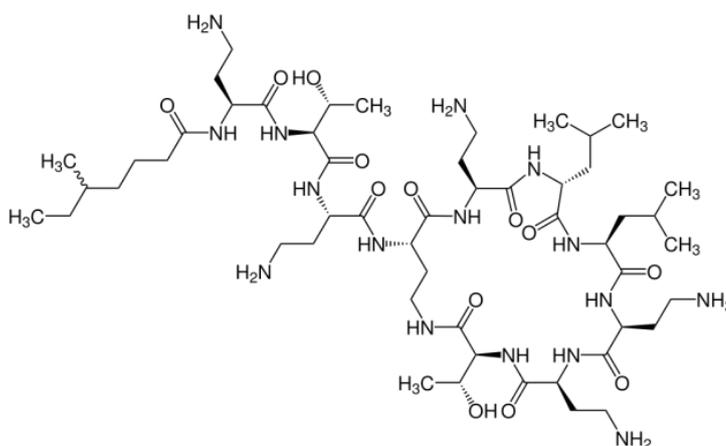


FIGURA 3. Estrutura do antibiótico polimixina A produzidos por *Paenibacillus*. Fonte: (Raza *et al*, 2008).

Seu espectro de ação inclui os *Bacillus* gram-negativos e positivos. No entanto, a polimixina possui efeito bacteriolítico sobre as bactérias gram-positivas, e bacteriostático sobre células gram-negativas (PIURI *et al*, 1998).

Um segundo grupo de compostos com atividade antibiótica produzidos por *P. polymyxa* são as fusaricidinas. As fusaricidinas são produzidas no início da esporulação e seus produtos pertencem à mesma ou semelhante família de antibióticos peptídicos gatavalina. São antibióticos lipopeptídicos constituído por um ácido graxo β -hidroxi ligado a um hexapeptídico cíclico (figura 4) (ALVAREZ *et al*, 2006).

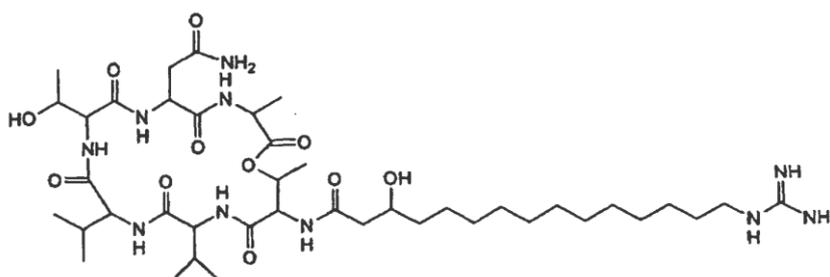


Figura 4. Estrutura do fusaricidina produzido por *Paenibacillus*. Fonte: (Raza *et al*, 2008).

Os compostos majoritário de fusaricidina produzidos por *Paenibacillus* são séries de peptídeos designados como LIF03, LI-F04, LI-F05, LI-F07 e LI-F08. Algumas substâncias antibacterianas têm sido isoladas e purificadas a partir de extratos de *P. polymyxa*. Um destes compostos, denominado de gaveserina (911Da), saltavalina (903Da), contém serina, alanina, leucina, tirosina, valina e 2,4-diamino-ácido butílico. Apesar destes compostos terem sido eluidos, muitas fusaricidinas não possuem sua estrutura e molecular caracterizada (MENENDEZ *et al*, 2016).

Muitas das espécies deste gênero produzem metabólitos secundários que podem promover o biocontrole contra patógenos. Contudo, tal informação sobre antibióticos de *P. polymyxa* são incipientes (LIANG; WANG, 2015). É perceptível que a família de Polimixina-Colistina circulina seja eficaz contra bactérias gram negativas, enquanto as Fusaricidinas sejam contra gram-positivas. Contudo, existem alguns compostos que são eficientes para ambos tipos de bactérias (LIANG; WANG, 2015).

É evidente que as estirpes de *P. polymyxa* produzem vários compostos antimicrobianos diferentes que refletem a sua diversidade genética e que mais compostos podem ser descobertos no futuro (LIANG; WANG, 2015). Assim, a espécie *P. polymyxa* pode ser usada no desenvolvimento e produção de novos peptídios e compostos policetídios com atividade antimicrobiana.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCBIO- **Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico- Registro de biodefensivos**. Disponível em: <http://www.abcbio.org.br/>, acessado em 05 de maio de 2016.

AGGANI, S. L. **Development of Bio-Fertilizers and its Future Perspective**. Scholars Academic Journal of Pharmacy., v.2, p.327-332, 2013.

AGUIAR L; KIMURA O; CASTILHO AMC; CASTILHO KSC; RIBEIRO RLD; AKIBA F; CARMO MG. F. **Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv.vesicatoria de pimentão e tomateiro**. Agronomia., v.34, p.78-82, 2000.

ALVAREZ, V.M.; VON DER WEID, I.; SELDIN,. SANTOS, A.L.S. **Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus***

peoriae NRRL BD-62 and *Peaenibacillus polymyxa* SCE2. Letters in Applied Microbiology., v.43, p.625-630, 2006.

ANDRADE, A.E.; FELIX, G.C.; OLIVEIRA, A.C.; NORONHA, E.F.; PEREIRA, J.L.; LIMA, L, H.C.; ROSATO, Y.B.; MELO, J.A.T.; JUNIOR, C.B.; MEHTA, A. **Expressão diferencial de proteínas de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* na interação com a planta hospedeira *Brassica olearacea*.** EMBRAPA, Boletim de pesquisa e Desenvolvimento., p.1-20, 2005.

ANDRADE, G. NOGUEIRA, M. A. **Bioindicadores para uma análise de risco ambiental, Organismos geneticamente modificado e grupos funcionais de microorganismos do solo.** In: Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento., v.34, p.13-21, 2005.

ANDRIÓN, E. E. B. **Supressividade natural de solos do nordeste brasileiro à murcha-de-fusário e rizoctoniose do caupi.** Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

BETTIOL, W. et al. **Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo.** In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio-Ambiente, p.183-205, 2009.

BORRET, C.; THILLAS, M.I.; ORDOVÁS, J.; AVELÉS, M. **Predictive factors for the suppression of fusarium wilt of tomato in plant growth media.** Phytopathology., 2004.

CÂNDIDO, E. S. **Caracterização de *Xanthomonas gardneri* e Análise Proteômica da Interação entre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Arabidopsis thaliana*.** **Dissertação** (Mestrado em Ciência Genômica e Biotecnologia). Universidade Católica de Brasília. Brasília. Distrito Federal. 2007.

CREVELIN, E. J.; CANOVA, S.P.; MELO, I, S.; ZUCCHI, T.D.; SILVA, R.E.; MORAES, L. A.B. **Isolation and Characterization of Phytotoxic Compounds Produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from Red Mangrove (*Rhizophora mangle*).**, Applied Biochemistry and Biotechnology.,v. 41, p.10-13, 2013.

DIJKSTERHUIS, Jan.; SANDERS, M.; GORRIS, L. G. M.; SMID, E. J. **Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*.** Journal of Applied Microbiology., v.86, p.13-21, 1999.

ELOY, J.C.; JÚNIO, A. E. **Aplicação de um extrato de biossurfactantes de *Bacillus subtilis* para extração de micro cistina-xr.** II Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. Anais. Campinas, 2012.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; DYNIA, J. F.; MAIA, A. H. N. **Efeitos de Adubos Nitrogenados de Solos na supressividade a Fitopatógenos.** Revista Ecossistema., Espírito Santo do Pinhal, v.26, p.6, 2001.

HAMDACHE, A.; AZARKEN, R.; LAMARTI, A.; ALEU, J.; COLLADO, I.G. **Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production.** Phytochemistry Reviews, v.12, p.685-716, 2013.

HELBIG, J. **Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr in strawberry by *Paenibacillus polymyxa*.** Journal of Phytopathology., v.149, p.265-273, 2001.

HOMEM, L. H. R. **Panorama atual dos discursos e posicionamentos sobre o uso de agrotóxicos no Brasil: A literatura cinetífica rural em foco. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas).** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

JAMES, B.; OLE, B. **Identifying Microorganisms Involved in Specific Pathogen Suppression in Soil.** Annual Review of Phytopathology., v. 45, p. 153-172, 2007.

KHUSRO, A.; AARTI, C.; PREETAMRAJ, J.P.; PANICKER, S.G. ***In vitro* Studies on antibacterial activity of aqueous extracts of spices and vegetables against *Bacillus licheniformis* strain 018 and *Bacillus tequilensis* strain ARMATI.** International Journal of current Microbiology and Applied Sciences., v.2, p.79-88, 2013.

KINKEL, L.L.; BAKKER, M.G.; SCHLATTER, D.C. **A co-evolutionary framework for managing disease-suppressive soils.** Rev Plant Pathol., v. 49, p.47-67, 2011.

KUMAR, P.; KHARE, S.; DUBE, R.C. **Diversity of Bacilli from Disease Suppressive Soil and their Role in Plant Growth Promotion and Yield Enhancement.**, New York Science Journal, v. 5, p.1-112, 2012.

LEIFERT, C. **Antibiotic Production and Biocontrol Activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45.** Applied Bacteriol., v.78, p.97-108, 1995.

LIANG, T. W.; WANG, S. L. **Recent Advances in Exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: Production, Isolation, Structure, and Bioactivities.** [Review]. Marine Drugs., v.13, p-1847, 2015.

MACHADO, A.L.M.; MICHEREFF, S.J.; LARANJEIRA, D.; DUDA, G.P.; NASCIMENTO, C.W.A.; NASCIMENTO, R.S.M.P.; RODRIGUES, J.J.V. **Agreste Soil characterization of Pernambuco as suppressiveness to fusarium wilt of tomato.** Summa Phytopathologica., v.30, p.271-276, 2004.

MAGESHWARAN, V.; WALIA, S.; GOVINDASAMY, V.; ANNAPURNA, K. **Antibacterial activity of metabolite produced by *Paenibacillus polymyxa* strain HKA-15 against *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*.** Indian Journal of Experimental biology., v.49, p. 229-233, 2011.

MALAVOLTA Jr. V.A. C.; ALMEIDA, I. M.; NETO, R, J.; ROBBS, C.F. **Bactéria fitopatogênica assinaladas no Brasil: uma atualização.** Summa Phytopathologica. Botucatu . v 34. p.9-38, 2008.

MAUGHAN, H.; GERALDINE, V.A. ***Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading.** Infection, Genetics and Evolution., v.11, p.789-797, 2011.

MAZID, M.; KHAN, T. A. **Future of Bio-fertilizers in Indian Agriculture.** International Journal of Agricultural and Food Research., v.3, p.10–23, 2014.

MENENDEZ E.; RAMÍREZ-BANENA. M. H.; FERNÁNDEZ-PASCUAL. M.; KLENK, H. P. VALÉZQUEZ, E.; MATEOS, P.F.; PEIX, A.; SCOTTI, M, R. ***Paenibacillus periandrae***

sp. nov., isolated from nodules of *Periandra mediterranea*. Microbiology Society resercha online. 2016.

MONTEIRO, L.; MARIANO, R. L.R.; SOUTO, A.M. **Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris***. Braz. arch. biol. technol., v.48, 2005.

MORANDI, M. A. B. **Controle Biológica de Doenças de Plantas no Brasil**. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio-Ambiente, p.183-205, 2009.

MOREIRA, A. F.; VARGAS, L. K., LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, L. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**., v. 63, p. 94-104, 2013.

MORRONI, I.V.; SCHINKE, C.; GERMANI, J.C. **Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris***. Revista Brasileira de Agroecologia., v.8, p.142-155, 2013.

NEERGAARD.A. **Soil biology and microbiology**. Land cover and soil sciences., v.6., 2015.
OLSEN, L.A.; EILEEN.R. C.; MACK. A. **The Social Biology of Microbial Communities: Workshop Summary**. Washington (DC): National Academies Press (US); 2012. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114831>. Acessado em: 3 de novembro de 2014.

PASTRE, R.; ANDREY, M.R.; MARINHO.; RODRIGUES-FILHO, E.; ANÔNIO, Q.L.; PEREIRA, J.O. **Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *murraya paniculata***. Química Nova., v.30, 2007.

PATHAK, K.V.; BOSE, A.; KEHARIA, K. **Characterization of Novel Lipopeptides Produced by *Bacillus tequilensis* P15 Using Liquid Chromatography Coupled Electron**. International Journal of Peptide Research and Therapeutics., v.20, n.2, p.133-143, 2014.

PENTON.C.R.; GUPTA, V.V.S.R.; TIEDJE.M.J.; NEATE.M.S.; KELLER, K. GILLINGS, M.; HARVEY, P.; PHAM, A.; ROGET, K, D.**Fungal community structure in disease suppressive soils assessed by 28S LSU gene sequencing.** PloS one 9., v.4, 2014.

PERES, L.E.P. **Metabolismo secundário, 2004.** Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, p. 1-26, 2004. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>. Acessado em: 06 de Dezembro de 2013.

PICHARD, B., LARUE, J. P., THOUVENOT, D. **Gavaserin and Saltavalin, new Peptide Antibiotics Produced by *Bacillus polymyxa*** . FEMS Microbiology Letters , v. 133, p. 215 - 218, 1995.

PIURI M., SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S.M. **A novel antimicrobial activity of a *Peanibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages.** Letters in Applied Microbiology, v. 27, p. 9-13, 1998.

RAAIJMARKES, J.M.; MAZZOLA, M. **Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria.** Annu Rev Phytopathol., v.50, p. 24-403. 2012.

RAZA, W; HEN, Y. Q-R. ***Peanibacillus Polymyxa*: antibiotics, hydrolytic Enzymes and Hazard assenment.** Journal of Plant Pathology., v.90, n.3, p.419-430, 2008.

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; HUANTE-GARGÍCA, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; SONOJA-RODRÍGUEZ, R. **Production of microbial secondart metabolites Regutalion by the carbono source.** Review Article: Critical Reviews in Microbiology., v. 36,p.146-167, 2010.

SANJU, B.; SAJEESH, P.K., KOSHY, A. **Exploring Entagonistic Effect of Endophyic Microorganisms Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Diefferenbachiae* (McCulloch & Pirone) *Vauterin* Causing Bacterial Blight of Anthurium.** International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnonology., v.7, p. 2, 2014.

SANSINENA, E.; ORTIZ, A. **Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp.** Biotechnol Lett., v.33, p.1523–1538, 2011.

SILVA c, R.S. **Identificação e caracterização de bioativos produzidos por bactérias de solo supressivo.** Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2014.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRÂNIO, M. S.; SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S.; BELASQUE, J.; FERREIRA, H. **Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** Journal of Bacteriology., v. 195, p.85–94, 2013.

SLEPECKY, R.A.; HEMPHILL, H.E. **The genus *Bacillus*-nonmedical.** Prokaryotes., v. 4, p. 530-562, 2006.

STARR, M. P.; STEPHENS, W. L. **Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*.** Journal of Bacteriology., v.87, p.293-302, 1964.

STEIN, T. ***Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions.** Molecular Microbiology., v.56, p. 845 -857, 2005.

TEBALDI, N. D.; PANIZZI, R. C.; SADER, R. **Detecção, Transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis.** Summa Phytopathologica, Botucatu, v.33, p.290-293, 2007.

VELASCO, P.; LEMA, M.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P. CARTEA, M.E. ***In Vivo* and *in Vitro* Effects of Secondary Metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*.** Molecules., v.18, p.11131-11143, 2013.

WELLER, D, M.; RAAIJMAKERS, J, M.; MCSPADDEN, G. B.B.; THOMASHOW, L.S. **Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens.** Rev. Phytopathol., v.40, p.309-348, 2002.

4. ARTIGO 1: ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS DO SOLO SOBRE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS*

O seguinte artigo está organizado de acordo com as normas de submissão para o periódico *Biological Control* (fator de impacto / JCR: 1.635; Qualis A2 na área de Ciências Agrárias I)

ABSTRACT

Suppressive soil bacteria with antimicrobial activity against *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

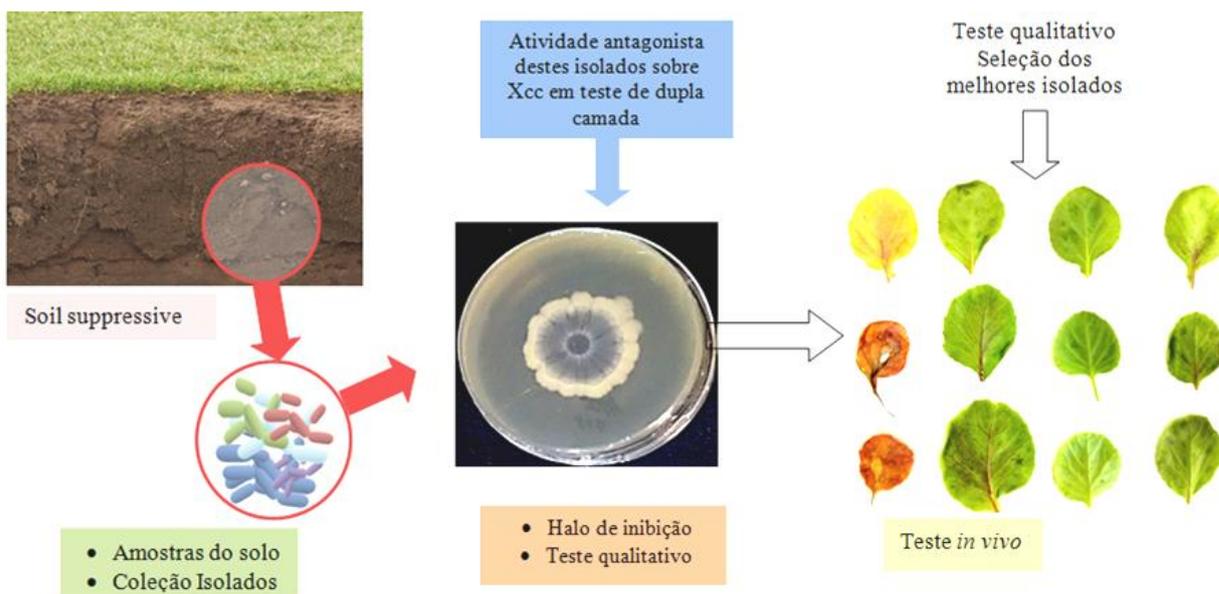
Xanthomonas campestris pv. campestris is a phytopathogenic bacterium, the causative agent of black rot in crucifers. For the control of plant pathogens diseases, there is the use of bacteria with activity antagonistic to the pathogen. Recent studies show that *Bacillus* species have on *X. campestris* a strong biological control. One of the mechanisms of this control is the production of secondary metabolites by these species. The objective of this work was to select bacteria *X. campestris* and antagonists to evaluate the antimicrobial activity of extracellular filtered bacteria (FEB) antagonist activity. To this, 257 bacteria isolated from a suppressive soil. They were evaluated in vitro antagonist activity by the technique of double layer. Ninety-two isolates (44.6%) were able to inhibit growth of the target pathogen (*X.campestris*). Of the 92 isolates selected on double layer of the test, 51 (55.43%) showed inhibition of growth of *X. campestris* on the inhibition assays with FEB in liquid medium. Thirteen of 50% or more inhibited the growth of the target pathogen, and the FEB-08, FEB-31-FEB 68, FEB 74-FEB-87 and were able to inhibit 100% growth of *X. campestris*. The FEB isolated TCDT-8, belonging to the genus *Paenibacillus*, it was used for in vivo tests in plant farming kale. The artificial inoculation kale with *X. campestris* pretreated with FEB-8 showed that the bacterium loses the ability to colonize and cause the cabbage black rot, indicating the potential use of this isolate to protect kale butter infection by *X. campestris*.

Key-words: Antagonist activity, black rot, biocontrol, cruciferous.

Highlights

- *Xanthomonas Campestris. pv campestris* é uma bactéria fitopatogênica causadora da podridão negra em crucíferas;
- *Bacillus e Paenibacillus*, isoladas do solo supressivo, inibiram fortemente o crescimento do fitopatógeno alvo *in vitro*;
- Cinco bactérias inibiram 100 % do crescimento de *X. campestris*;
- *Paenibacillus* mostrou-se eficiente, em teste *in vivo*, em plantas de couve-Manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

Resumo gráfico



4.1.Introdução

A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é uma bactéria fitopatogênica pertencente ao filo *Proteobactéria*. Este fitopatógeno é o agente casual da podridão negra, especialmente em *Brassicaceae* pertencentes a família *Brassicaceae* (Andrade et al., 2005). Em geral, essa bactéria causa danos ao tecido foliar da planta hospedeira, afetando folhas, nervura e limbo. Alguns destes sintomas são característicos, como a presença de lesões em forma de “V”; escurecimento de nervuras, microvasos no pecíolo e caule resultando na murcha e necrose dos tecidos foliares (Morrone et al., 2013). O controle da doença pode ser feito através de cultivo de variedades das plantas resistentes a podridão negra, eliminação de plantas infectadas, bem como o emprego de sementes sadias. (Wulff et al., 2002; Tebaldi et al., 2007). Tradicionalmente, o controle químico da podridão negra tem sido feito com antibióticos e produtos à base de cobre. No entanto, com o uso indiscriminado desses produtos pelos agricultores, populações de bactérias resistentes surgiram, contribuindo para a ineficiência desses produtos (Aguiar et al., 2000). Uma estratégia utilizada tem sido a descoberta de micro-organismos de solo supressivo. (Bettiol., 2009; Kinkel., 2011, Moreira et al., 2013). As atividades antagonistas destas bactérias, sobre fungos e outros patógenos, são associada a produção de moléculas denominadas Metabólitos Secundários (MS) (Raaijmarkes et al., 2012). Os MS são compostos sintetizados na fase estacionária de crescimento do micro-

organismo e geralmente são produtos de excreção. Essas moléculas vem sendo utilizadas para diversos fins, tais como antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de respostas imunológicas, ferormônios e promotores de crescimento de animais e plantas (Stein., 2005; Sansinenea e Ortiz., 2011). Assim, devido ao interesse na busca por novos micro-organismos com atividade antimicrobiana, este estudo teve como principal objetivo selecionar isolados bacterianos, de solo supressivo, com atividade antimicrobiana sobre *X.campestris*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Isolados bacterianos e condições de crescimento

Para selecionar bactérias com atividade antimicrobiana sobre o fitopatógeno-alvo *X. campestris*, uma coleção de 257 bactérias, pertencentes a Coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, foi utilizada. Os isolados bacterianos dessa coleção foram obtidos a partir de três solos supressivos a fitopatógenos, localizados na região Agreste do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (S1- Município de Bonito; S2- Camocim de São Felix e Bezerros) (Andrión, 2009). Os isolados bacterianos foram reativados, em meio Yeast Malt Agar (YMA) e incubados sob agitação orbital (150rpm/28°C ± 2) até observação da turvação da cultura indicando o crescimento. As culturas foram ao mesmo tempo plaqueadas em YMA adicionado de ágar (20 g.L⁻¹) para observação quanto à pureza da cultura. O fitopatógeno-alvo *X.campestris* 629 IBSBF foi obtida da coleção de culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas-SP e recuperada em 20 mL de caldo YM (Yeast-Malt) contido em erlenmeyer de 125 mL sob agitação orbital (150 rpm/28°C ± 2) até o crescimento.

4.2.2. Atividade antagonista

A atividade antagonista dos, 257 isolados bacterianos, foi avaliada pelo método da dupla-camada. Para isso, o inóculo foi reativado como descrito no item 4.2,1 e re-inoculado em Erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de meio YMA. Após inoculação as culturas foram incubadas (30°C/150rpm) até fase exponencial de crescimento. A fase exponencial de crescimento foi determinada espectrofotometricamente pela Densidade Ótica (DO) de 0,5 – 0,8 a 600 nm. Alíquotas de 2 mL da cultura em fase exponencial foram centrifugadas e as células lavadas duas vezes em NaCl a 0,85% para remover o excesso de meio de cultura (20817g /4°C por 5 minutos). O pellet celular foi ressuspensionado em NaCl a 0,85% até DO de 0,5 – 0,8 a 600 nm, para padronização do inóculo. Em seguida, spots contendo volumes de 10 µL de inóculos padronizados das 257 bactérias foram inoculados em placas de Petri contendo meio YMA Agar. Após secagem dos spots, as placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. Depois desse período de incubação, adicionou 1 mL da suspensão do fitopatógeno-alvo *X. campestris* e 9mL do meio YM ágar, foi misturado em tudo de ensaio 10mL e espalhados sobre placas Petri contendo os spots dos isolados-teste previamente incubados por 7 dias e dos controles positivo (ampicilina) e negativo (água esterilizada). Após inoculação do fitopatógeno-alvo, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição foram observados. Os testes foram realizados em triplicata para cada isolado.

4.2.3. Preparado do filtrado extracelular bacteriano (FEB)

Os isolados bacterianos com atividade antagonista foram reativados e posteriormente re-inoculados em meio YMA (de acordo com o item 4.2.3) e incubados por 7 dias sob agitação orbital ($28^{\circ}\text{C} \pm 2/150$ rpm). Foi pré-estabelecida uma absorvância maior que 2,5 em espectrofotômetro (λ 600 nm) para coleta da cultura em meio YMA a fim de assegurar que todos os isolados atingissem a fase estacionária do crescimento e pudessem produzir seus metabólitos secundários. Para preparo do FEB, uma alíquota de 2 mL da cultura foi centrifugada a $20817g$ durante 45 min e o sobrenadante filtrado em membrana de nitrocelulose (TPP®) $0,22\mu\text{m}$. Os filtrados extracelulares livres de células foram armazenados a -20°C para posterior avaliação nos testes de antagonismo em meio líquido (placas de microtitulação).

4.2.4. Atividade antimicrobiana do filtrado extracelular bacteriano

O fitopatógeno-alvo foi cultivado em Erlenmeyers (125mL) contendo 50 mL do meio YM a $30^{\circ}\text{C}/150\text{rpm}$ até observação de Densidade Ótica (DO) entre 0,5- 0,8 a 600 nm, aferida em espectrofotômetro (λ 600 nm) indicando o início da fase exponencial (log) de crescimento. Em seguida, alíquotas de 2 mL da cultura, em fase exponencial, foram centrifugadas e as células lavadas duas vezes em NaCl a 0,85% para remover o excesso de meio de cultura ($20817g$ 4°C por 5 minutos). O pellet foi ressuscitado em NaCl 0,85% até DO de 0,5-0,8nm a 600 nm, para padronização do inóculo. A partir do inóculo padronizado, uma alíquota de $500\mu\text{L}$ foi inoculada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio YM até observação de DO entre 0,5-0,8 a 600 nm, aferida em espectrofotômetro (λ 600 nm). Para o preparo do tratamento-resposta, alíquotas de $42,5\mu\text{L}$ da cultura de Xcc padronizada foram distribuídas em poços de placas de microdiluição, cada poço recebeu também $42,5\mu\text{L}$ de cada filtrado extracelular e $215\mu\text{L}$ do meio YM estéril. Como controles negativo foram utilizados: um poço contendo $300\mu\text{L}$ do meio YM estéril, um poço contendo $42,5\mu\text{L}$ dos filtrados bacterianos + $257,5\mu\text{L}$ do meio YM estéril e um poço contendo $42,5\mu\text{L}$ do meio YMA estéril + $42,5\mu\text{L}$ do inóculo padronizado da Xcc + $215,5$ do meio YM estéril. Como controles positivos, foram utilizadas três concentrações do antibiótico ampicilina ($8, 10$ e $12\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) acrescido a $42,5\mu\text{L}$ da cultura de Xcc e completados para $300\mu\text{L}$ do meio YM estéril. As placas permaneceram incubadas a 30°C por um período total de 72 horas, com leituras de absorvância (λ 600 nm). Esse procedimento foi realizado em triplicata. A coleta dos dados foi realizada em equipamento leitor de microplacas SYNERGYH1. Os resultados foram expressos como taxa de inibição em índice percentual (%) que representou a diferença da média de absorvância de cada tratamento em relação ao crescimento controle.

4.2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana do FEB-08, em diferentes tempos da curva de crescimento

A avaliação da atividade antagonista, em diferentes tempos da curva de crescimento, do filtrado extracelular bacteriano FEB de *Paenibacillus* de TC-DT08 (FEB-08) foi determinada pela técnica de microdiluição, conforme descrita no item 2.3. Após este procedimento, o FEB-08 livre de célula foi armazenado a -20°C para posterior avaliação nos testes antimicrobianos

em microplacas. Para avaliação da atividade antimicrobiana, alíquotas de 42,5µL da cultura de Xcc padronizada foi distribuída em poços de placas de microdiluição, cada poço recebeu 42,5 µL de cada filtrado extracelular (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dia de incubação) e 215µL do meio YM estéril. Como controles negativos foram utilizados: um poço contendo 300 µL do meio YM estéril, um poço contendo 42,5µL dos filtrados bacterianos + 257,5µL do meio YM estéril e um poço contendo 42,5µL do meio YMA estéril + 42,5µL do inóculo padronizado da Xcc + 215, 5 do meio YM estéril. Como controles positivos, foram utilizadas três concentrações do antibiótico ampicilina (12 µg.µL⁻¹).

4.2.6. Afiliação dos isolados

A afiliação taxonômica dos isolados, como maior taxa de inibição foi realizada com base nas sequências parciais do gene RNAr 16S. Os DNAs genômicos obtidos foram armazenados em 40µL de tampão TE (pH 8,0) sob temperatura de -20°C. Estes foram quantificados em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c). O DNA extraído foi amplificado por PCR utilizando os *primers* 27F e 1488R (ADERIBIGBE *et al.*, 2011). Os produtos da PCR foram purificados com o kit GE Healthcare Life Systems, sendo enviados para o sequenciamento no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-tronco, Instituto de Biociências, USP. As sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram comparadas às sequências de bactérias de cultura-tipo depositadas nas bases de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o programa BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4.2.7. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A Concentração Mínima Inibitória, do filtrado extracelular bacteriano FEB-08 foi determinada pela técnica de microdiluição. Para isso o FEB-08 foi inicialmente liofilizado e a amostra na forma de pó seco foi dissolvida em meio YM na concentração de 10 mg.mL⁻¹. Após a diluição em série (512µg.mL⁻¹ a 1µg.mL⁻¹), o FEB-08 foi distribuído em placa de microdiluição de 96 poços. Em cada poço foi adicionado, 100 µL de cada uma das diluições do FEB-08 e 100µL do fitopatógeno alvo (padronizado para 10⁸ UFC/ poço). O controle negativo consistiu em 100µL de YM e 100µL do fitopatógeno alvo; o controle positivo foi ampicilina (12µg /mL). Após a incubação das placas de ensaio a 30 °C durante 244 horas, as placas foram lidas em λ = 600 nm. O MIC foi determinado como a menor concentração do FEB que resultou em 100% da inibição de Xcc. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.8. Teste *in vivo*

Para o teste *in vivo*, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos, sendo cada tratamento composto por dez vasos com uma planta. Três folhas verdadeiras, com tamanho médio de 3cm (altura) por 4cm (largura) foram escolhidas para a infiltração. No total foram usadas 30 folhas por tratamentos, sendo 600 folhas em todo o experimento. As plantas de couve-Manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) foram mantidas sob condições de estufa de 25°C a 35°C. Cada vaso recebeu 5 Litros de compostagem de resíduos composto por casca de coco seco, esterco e resíduos orgânicos. As testemunhas utilizadas neste experimento foram as plantas das mesmas cultivares infiltradas com; somente com o o meio YM, com o meio YM e o FEB-08;

FEB-08 e FEB-08 como o fitopatógeno-alvo. Para o teste de infiltração de Xcc foi cultivada 100 mL de Xcc em meio YM até a densidade óptica (DO) a 600 nm atingir ~ 1; As células foram diluídas para 10^8 UFC.mL⁻¹ em YM e tratadas com o 100 mL do FEB -08 durante 24h a 30 °C. Após este período, 2mL (1:1) da suspensão de células foram infiltradas na superfície axial de folhas usando seringas hipodérmicas. Para avaliação do aparecimento ou não dos sintomas nas folhas infiltradas as plantas foram observadas ao longo de três (3) semanas. Para a obtenção dos dados quantitativos, utilizou-se um escala de notas de 0 e 1, onde: 0 folhas sem sintomas 1= necrose foliar e queda da folha.

4.3.Resultados

4.3.1.Atividade antagonista *in vitro* de bactérias contra *Xanthomonas campestris. pv campestris*

Dos 257 isolados testados, 44,6% (92 isolados) foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno-alvo (*Xanthomonas campestris* 629 IBSB), (ANEXO).

4.3.2.Atividade antimicrobiana do filtrado extracelular bacteriano

Os filtrados extracelulares bacterianos das 92 bactérias que apresentaram efeito inibitório no crescimento do fitopatógeno-alvo foram preparados e utilizados em testes quantitativos de inibição em meio líquido. Dos 92 filtrados testados, 13 inibiram 50% ou mais do crescimento do fitopatógeno- alvo (Anexo), sendo que os FEB-8, FEB-31, FEB-68, FEB-74 e FEB-87 foram capazes de inibir 100% do crescimento de Xcc 629 IBSB (figura 1).

4.3.3.Avaliação do FEB e atividade antagonista em diferentes tempos de curva de crescimento

A atividade antimicrobiana para o FEB-08 sobre Xcc 629 IBSB ocorreu no primeiro dia de incubação, mantendo-se por 7 dias após o experimento (Figura 2).

4.3.4.Identificação das bactérias com atividade antimicrobiana

Dez isolados com maior atividade antimicrobiana do extrato extracelular bacteriano, *in vivo* contra o fitopatógeno-alvo, foram previamente identificados através do sequenciamento de um fragmento do gene 16S rRNA. Quatro isolados pertencem a espécies do gênero *Bacillus* e um isolado ao gênero *Paenibacillu*. Oito isolados estão sendo identificadas (tabela 1).

4.3.5.Concentração Mínima Inibitória do FEB- *Paenibacillus*

O MIC determinado para o FEB-08 sobre Xcc 629 IBSB foi de 128 ug/mL.

4.3.6.Determinação da atividade antimicrobiana *In vivo*

O FEB-08 impediu completamente a capacidade de Xcc 629 IBSB de causar a podridão negra e na couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) (Figura 3B). Em contrapartida as

plantas tratadas com o inoculo do fitopatógeno-alvo apresentaram 100% das folhas com tombamento por necrose (Figura 3A). Além disto, os tratamentos com o meio líquido YM não induziram qualquer alteração do fenótipo das plantas (0% de sintomas) (Figura 3D). Nota-se que a infiltração do FEB-08 sem *X. campestris* ou com YM não produziram quaisquer lesões nas folhas (Figura 3D). As plantas sem tratamentos não apresentaram qualquer sintoma de lesão (Figura 3C).

4.4. Discussão

A busca por agentes de biocontrole no combate a podridão negra causada por *X. campestris* é uma tarefa difícil, aja visto das dificuldades encontradas no isolamento de bons agentes de biocontrole e natureza agressiva da doença. Entretanto, a seleção de eficientes antagonistas dos solos podem fornecer novos agentes de controle biológico (ACB) no combate dessa doença. A estratégia utilizada no presente trabalho permitiu selecionar de solos supressivos 92 bactérias (42%) com atividade antagonista sobre Xcc 629 IBSB. Esse percentual é maior do que o relatado na literatura, por exemplo, Balan *et al*, obtiveram 21,62% de bactérias antagonistas contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Diefferenchiae* (Balan et al., 2014) e Mishra et. al selecionaram 6,32% de antagonistas sobre a *X. campestris* (Mishra., and Arora., 2012). Muitas das bactérias antagonistas relatadas são pertencentes ao gênero *Bacillus*. Este gênero se destaca quanto à capacidade de inibir uma ampla variedade de micro-organismos, sendo muito utilizado no biocontrole de fitopatógenos, que causam diversas doenças tais como: tombamentos de plântulas, podridões de raízes, murchas vasculares e galhas e a podridão negra, causada por *X. campestris* (Morrone et al., 2013). Nesse presente estudo, trezes bactérias inibiram 50% ou mais do crescimento de *X. campestris* no teste *in vitro* utilizando o extrato extracelular bacteriano. Quatro desses isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* e um ao gênero *Paenibacillus*. O FEB-08 apresentou elevada atividade inibitória contra o fitopatógeno-alvo seguido de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*. Os resultados, de antibiose *in vitro*, tanto em meio sólido (teste da dupla-camada) como utilizando o FEB, sugerem que, os efeitos inibitórios podem está relacionada com a produção de compostos antimicrobianos. Estas cepas produzem antibióticos, sideróforos e enzimas extracelulares, mas o principal composto ativo, contra diferentes espécies de *Xanthomonas* tem sido identificado como metabólitos secundários (Moreira et al., 2013). Todas as bactérias com atividade inibitória foram testadas em sua fase estacionária de crescimento pois sabe-se que muitos dos metabólitos secundários são sintetizados nesta fase. Contudo, alguns filtrados, a exemplo do FEB-08, produzido pelo isolado TC-DT08 apresentou valores inibitórios na fase exponencial, o que corrobora com alguns estudos sobre produção de metabólitos primários na fase inicial de crescimento (Raza 2008). Muitos destes antibióticos são produzidos por diferentes espécies de *Bacillus*. Leifert et al., 1995 estudaram duas espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* CL27 e *B. pumilus* CL45, relataram que a atividade exercida *in vivo* contra *Botrytis cinerea* pelo *B. subtilis* CL27 era devida à produção de MS peptídeos não-ribossomais, pois mutantes dessa espécie, incapazes de produzir o antibiótico, deixavam de apresentar atividade contra esse patógeno (Leifert et al., 1995). De forma semelhante, Pichard et al., 1995 relataram que a atividade *in vitro* contra *X. campestris*, apresentada por *B. polymyxa*, era devido a produção de dois antibióticos: a gavaserina e satavalina (Pichard et al., 1995). Outras espécies de bactérias com atividade de

biocontrole têm sido reportada, tais como *Pseudomonas*, *Streptomyces* e actinobactérias. Há vários estudos sobre atividade antimicrobiana dos micro-organismos desta última classe contra bactérias e fungos patogênicos, incluindo *Ralstonia solanacearum*, *Thielaviopsis* e *Xanthomonas* (Aliye et al., 2008). A atividade deste grupo corresponde à produção de 80% de todos os antibióticos conhecido no mundo, sendo a maior parte produzida pelo gênero *Streptomyces*. Entre os actinomicetos, em média, 7600 compostos são produzidos por *Streptomyces*. Os antibióticos produzidos por este gênero são conhecidos, a exemplo da streptomina, canamicina, antraciclina, Dexorubicina e tetraciclina (Chaudhary et al., 2013). Contudo, esta alta porcentagem não exclui a participação de produtos a base de *Bacillus* no controle biológico de doenças. Mais de 23.000 metabolitos secundários já foram relatados e cerca de 150 são usados na agricultura, farmacologia, ou outras áreas (Crevelin et al., 2013). Apesar da grande quantidade de bioprodutos já disponíveis, ainda é incipiente no mercado a disponibilidade e uso de produtos para tratamento de podridão negra causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em *Brássicas* (Chaudhary et al., 2013; Crevelin et al., 2013). As estratégias utilizadas, no combate desta doença, têm sido empregadas de forma preventiva: como a preservação da contaminação da cultura pelo uso de material propagativo sadio e de boa qualidade e/ou destrutivas: a exemplo da retirada e destruição de plantas inteiras ou parte delas, o que causa perdas consideráveis na produtividade (Morrone et al., 2013). Como alternativa, métodos químicos são utilizados, tais como fungicidas com ação bactericida e antibióticos de uso agrícola (Mazid and Khan., 2014) Os fungicidas mais comumente empregados são os cúpricos (calda borbalese, sulfato de cobre, oxiclora de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso) e os carbonatos. Atualmente, além dos cúpricos, apenas os princípios ativos acibenzolar-S-metil (ASM) e cloretos de benzalcônio, possuem registro para a cultura no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA,2016) com indicação para o controle da podridão negra (Mazid and Khan., 2014; Melo et al., 2011) .O ASM é um indutor da resistência da própria planta, e os cloretos de benzalcônio são amônias quaternárias que agem por contato e induzem resistência localizada (CIETEC., 2008). Com relação aos antibióticos, existem 4 produtos comerciais, à base de oxitetraciclina, estreptomina, terramicina ou kasugamicina, registrados para uso agrícola (Nascimento et al., 2013). As concentrações utilizadas por agricultores são elevadas. Recomenda-se a aplicação de concentrações de 3 kg.L⁻¹ de terramicina por hectare de lavoura (Nascimento et al., 2013; Aguiar et al., 2000), em contrapartida, nossos resultados indicam um elevado potencial de ação antimicrobiana para para o FEB-08 sobre *X. campestris*, alcançando uma concentração mínima inibitória de 128 ug/mL, contudo essa concentração mínima ainda não pode ser comparada as aplicadas em campo, uma vez que testes com pulverização em diferentes concentrações devem ser realizados. Experimentos *in vivo*, em casa de vegetação, com o FEB-08, demonstraram 100% de eficiência no controle a doença causada por *X. campestris*. Outros resultados, em casa de vegetação foram relatados em plantas de tomanterio, e alguns estudos relacionam o controle biológico e /ou uso de antibiótico contra Xcc 306 (Byrne et al., 2005). Em um estudo com citros, pode-se observar a redução de 93,5 % na formação de lesão (efeito curativo) em plantas tratadas com a fração produzida por *Pseudomonas* (de Oliveira et al., 2011). Os resultados do teste *in vivo* deste presente trabalho demonstram o potencial deste *Bacillus* na prevenção da infecção por *X. campestris* em plantas de couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Independente do mecanismo de ação, o controle biológico com FEB (TCDT-08) impediu, direta ou indiretamente, *X. campestris* de

colonizar a planta hospedeira demonstrando que compostos produzidos por FBE (TCDT-08) conferem proteção substancial contra a infecção de *X. campestris* em couve-manteiga nas condições testadas. Em conclusão, foram selecionadas bactérias com eficiente atividade antimicrobiana sobre *X. campestris*. Os resultados apresentados neste estudo mostram que o isolado *Paenibacillus* (TC-DT08) apresenta atividade *in vitro* e em *in vivo* sobre *X. campestris* sendo esta bactéria um potencial agente para uso no controle biológico da podridão-negra. Estudos futuros irão determinar o efeito curativo em couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e a eficácia sob condições de campo.

4.5.Referencial Bibliográfico

- Aguiar, L., Kimura, O., Castilho, A. M. C., Castilho, K. S. C., Ribeiro, R. L. D., Akiba, F. Carmo, M. G. F. 2000. **Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* vesicatoria de pimentão e tomanteiro.** Agronomia. 34. 78-82.
- Aliye, N., Fininsa, C., & Hiskias, Y. 2008. **Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*).** Biological Control, 47, 282–288.
- Balan, S., Saheesh P.K., Abraham Koshy. 2014. **Exploring Entagonistic Effect of Endophytic Microorganisms Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* (MacChulloch & Pirone) Vauterin Causing Bacterial Blight of Anthurium.**, 2014. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology., 7, 305-312.
- Byrne, J.M., Dianese, A.C., Jia, P., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. **Biological control of bacterial spot of tomato underweld conditions at several locations in North America.** Biological Control 32, 408–418.
- Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., Shrivastava, S. 2013. **Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production.** Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(8). 84-94.
- CIETEC. **Inovações e empreendedorismo.** 2010, 31 de outubro. Aprovado primeiro defensivo agrícola nacional para uso no cultivo de cenouras, tomates e batatas. Disponível em: <http://www.cietec.org.br/index.php?id1=30&id2=130>.
- Crevelin, E. J., Canova, S. P., Melo, I. S., Zucchi, T. D., Da Silva, R. E., & Moraes, L. A. B. 2013. **Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *streptomyces* sp. AMC 23 from red mangrove (*Rhizophora mangle*).** Applied Biochemistry and Biotechnology, 171, 1602–1616.

- de Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L. de P., Beranger, J. P. de O., Martin, J. A. B. S., ... Andrade, G. 2011. **Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain.** *Biological Control*, 56, 125–131.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Harbour, A. 1995. **Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45.** *The Journal of Applied Bacteriology*, 78(2), 97–108.
- Mazid, M., Khan, T. A. 2014. **Future of Bio-fertilizers in Indian Agriculture: An Overview.** *International Journal of Agricultural and Food Research*, 3(3), 10–23.
- Mello, M.R.F.; Silveira, E.B.; Viana, I.O.; Guerra, M.L.; Mariano, R.I.R. 2011. **Uso De antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa.** *Horticultura Brasileira.*, 29. 78-83.
- Mishra, S., Arora, N. K. 2012. **Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 28 (2), 693–702.
- Moreira, A. F., Vargas, L, K., Lisboa, B. B., Favreto, R., Baldani, L. I., Passaglia, L. M. P. 2013. **Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil.** *Applied Soil Ecology.*, 63, 94-104.
- Morrone, I. V., Schinke, C.; Germani, J.C. 2013. **Nova proposta para uso de bacteriófagos no controle de mancha foliar em repolho, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*.** *Revista Brasileira de Agroecologia.*, 8 (1).142-155.
- Nascimento, A.R., Fernandes, P.M., Borges, L.C; Moita, A.W., Quezado-duval A.M. 2013. **Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo.** *Horticultura Brasileira* 31: 15-24.
- Pichard, B., Larue, J. P., & Thouvenot, D. 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. *FEMS. Microbiology Letters.*, 133(3), 215–218.
- Raza, W., Yang, W., Shen, Q. R, 2008. ***Paenibacillus polymyxa*: Antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment.** *Journal of Plant Pathology.*, 90 (3). 419-130.

TABELAS

Tabela 1. Identificação de bactérias isoladas de solo supressivo a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

FIGURAS

Figura 1. Atividade antimicrobiana dos filtrados bacterianos (FBE) sobre *X. Campestris*. Teste realizado em meio líquido. Controle positivo: Ampicilina (D12amp) na concentração de $12\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Figura 2. Atividade antimicrobiana dos FEB-*Paenibacillus*, em diferentes dias, sobre Xcc 629 IBSB. Teste realizado em meio líquido. Controle Ampicilina ($12\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Figura 3. FRENTE DO LIMBO. Efeito do FEB (TC-DT08) sobre a capacidade Xcc 629 IBSB induzir sintomas de podridão Negra. (A) folha tratada com Xcc 629 IBSB; (B) Folhas submetidas a tratamento com o FEB (TC-DT08) por um período de 24h; (C) Folhas não submetidas a qualquer tratamento; (D) Folhas tratadas somente com meio YM líquido, FEB (TC-DT08) e folhas tratadas com injeção de FEB (TC-DT08) em meio YM líquido.

Tabela 1 .Identificação de bactérias isoladas de solo supressivo a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Isolados	Sequência com máxima similaridade*	Similaridade (%)	Família afiliada
TC-DT8	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	99%	<i>Paenibacillaceae</i>
TC-DT31	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT34	<i>Bacillus anthracis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
TC-DT64	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT68	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
TC-DT74	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
TC-DT75	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT87	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT100	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	<i>Bacillaceae</i>
TC-DT109	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT126	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT132	Ausente	Ausente	Ausente
TC-DT164	<i>Bacillus metylophilus</i>	Ausente	<i>Bacillaceae</i>

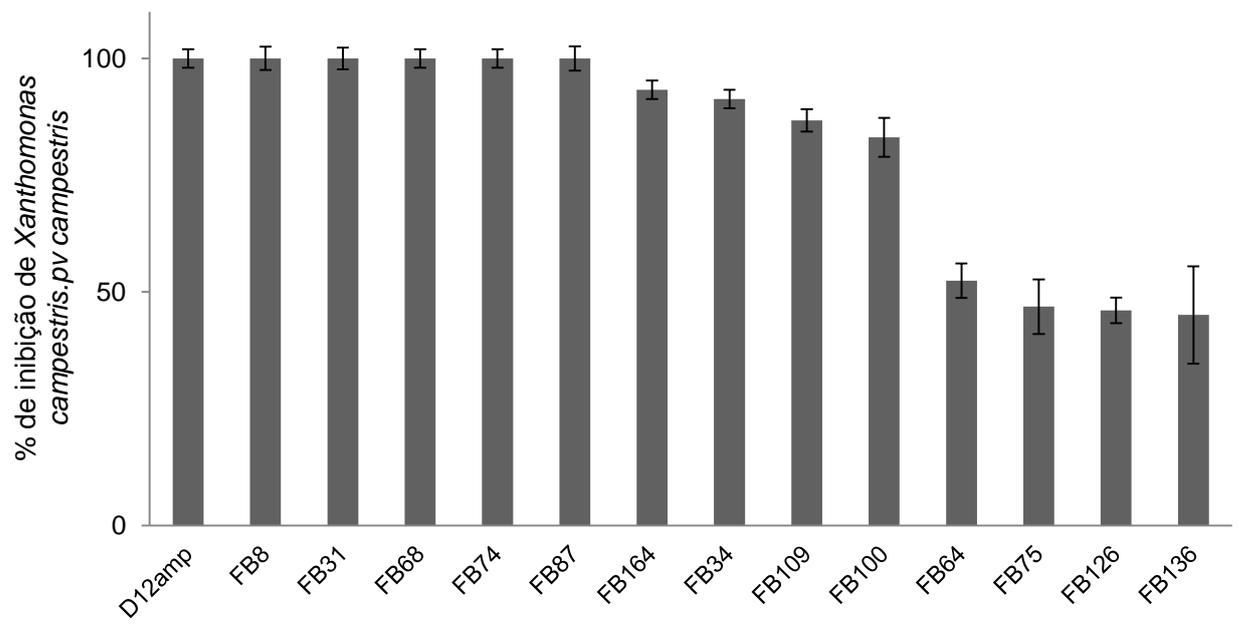


Figura 1.

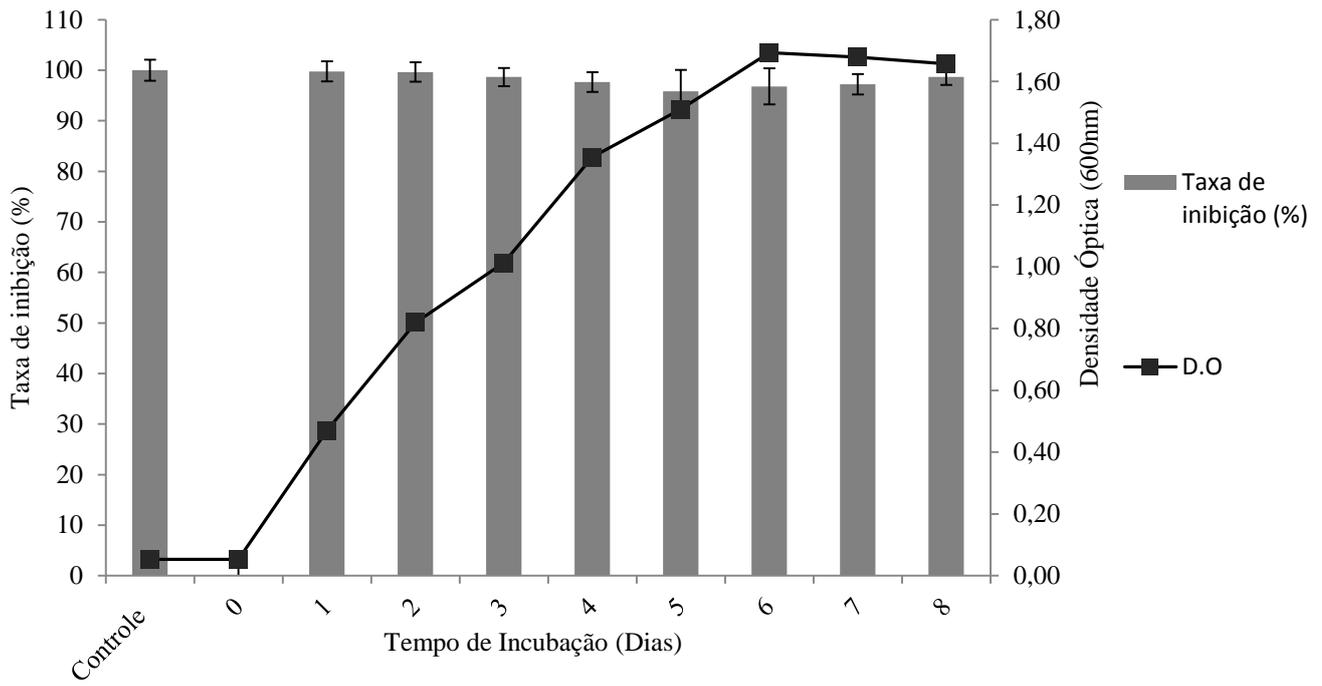


Figura 1.

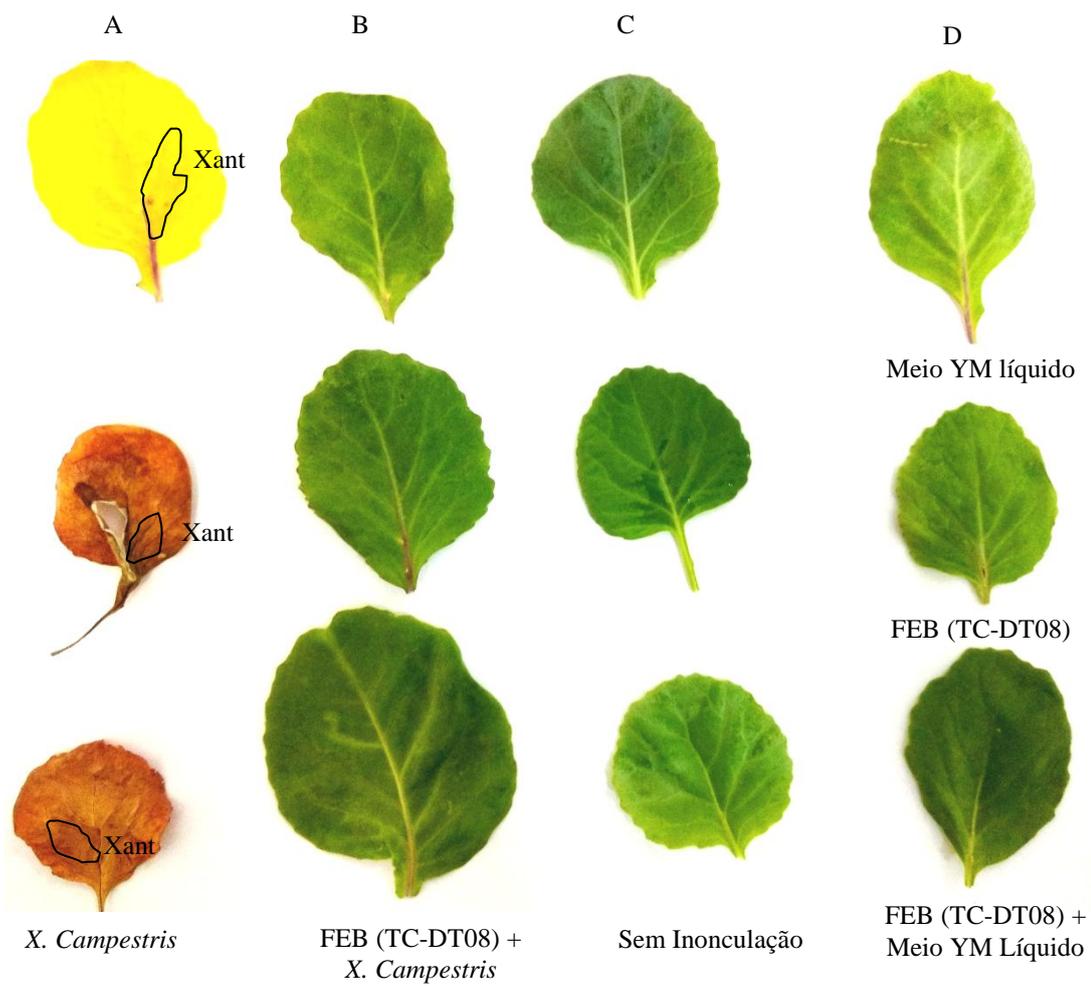


Figura 2.

ANEXOS

Tabela 1a. Inibição in vivo do crescimento de *X.campestris pv campestris* por bactérias antagonistas

Gráfico 1a. Atividade antimicrobiana do filtrado extracelular bacteriano.

Gráfico 2a. Curva de crescimento de Xcc 629 IBSB.

Figura 1a. Efeito inibitório de 92 isolados no crescimento do fitopatógeno, em teste *in vitro* (dupla-camada). imagem (a); moderado +++ , ++ (4,00-2,01) , imagem b e fraco + imagem c (2,00-0,5). imagem d bactéria sem atividade inibitória.

Figura 2a. Experimento in vivo, método de infiltração para : imagens (a): tratamento 2 FEB (DT-TC08) e fitopatógeno alvo (b) Tratamento 7: Meio YM líquido (c) Tratamento 7: FEB (TC-DT08) (d) Tratamento X21: Xcc (e) Casa de vegetação (f) Verso do Limbo.

TABELA 1A. Inibição in vivo do crescimento de *X.campestris pv campestris* por bactérias antagonistas.

Isolados	Grau de inibição	Família Afiliada
TC- DT221	+	Ausente
TC- DT189	+	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT124	+	Ausente
TC-DT4	+	Ausente
TC-DTT57	+	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT77	+	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TC-DT134	+	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT170	+	<i>Bacillus toyonensis</i>
TC-DT194	+	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT244	+	Ausente
TC-DT245	+	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT257	+	Ausente
TC-DT181	+	Ausente
TC-DT106	+	<i>Bacillus cereus</i>
TC-DT148	+	Ausente
TC-DT152	+	Ausente
TC-DT 2	++	Ausente
TC-DT55	++	Ausente
TC-DT64	++	Ausente
TC-DT108	++	Ausente
TC-DT15	++	Ausente
TC-DT31	++	Ausente
TC-DT47	++	Ausente
TC-DT68	++	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TC-DT110	++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT116	++	<i>Bacillus cereus</i>
TC-DT126	++	Ausente
TC-DT220	++	Ausente
TC-DT224	++	Ausente
TC-DT155	++	Ausente
TC-DT179	++	Ausente
TC-DT145	+++	Ausente
TC-DT10	+++	Ausente
TC-DT32	+++	Ausente
TC-DT48	+++	<i>Bacillus toyonensis</i>
TC-DT66	+++	Ausente
TC-DT70	+++	Ausente
TC-DT166	+++	Ausente
TC-DT167	+++	Ausente
TC-DT99	+++	Ausente
TC-DT246	+++	Ausente
TC-DT102	+++	Ausente
TC-DT242	+++	Ausente
TC-DT204	+++	Ausente
TC-DT187	+++	Ausente

TC-DT188	+++	Ausente
TC-DT 1	+++	<i>Bacillus aerius</i>
TC-DT11	+++	Ausente
TC-DT14	+++	<i>Bacillus tequilenses</i>
TC-DT29	+++	<i>Bacillus cereus</i>
TC-DT34	+++	<i>Bacillus anthracis</i>
TC-DT37	+++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT54	+++	Ausente
TC-DT58	+++	Ausente
TC-DT74	+++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT75	+++	Ausente
TC-DT83	+++	Ausente
TC-DT86	+++	Não identificado
TC-DT87	+++	Ausente
TC-DT65	+++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT109	+++	Ausente
TC-DT111	+++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT127	+++	Ausente
TC-DT128	+++	Ausente
TC-DT136	+++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT146	+++	Ausente
TC-DT151	+++	Ausente
TC-DT132	+++	Ausente
TC-DT100	++++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT130	++++	<i>Bacillus toyonensis</i>
TC-DT171	++++	Ausente
TC-DT190	++++	<i>Bacillus subtilis</i>
TC-DT197	++++	Ausente
TC-DT198	++++	Ausente
TC-DT243	++++	<i>Bacillus megaterium</i>
TC-DT230	++++	Ausente
TC-DT238	++++	Ausente
TC-DT44	++++	Ausente
TC-DT79	+++++	<i>Bacillus toyonensis</i>
TC-DT223	+++++	<i>Bacillus aryabhatai</i>
TC-DT229	+++++	Ausente
TC-DT8	+++++	<i>Peanibacillus polymyxa</i>
TC-DT163	+++++	Ausente
TC-DT164	+++++	<i>Bacillus metylotrophicus</i>
TC-DT147	+++++	<i>Bacillus toyonensis</i>
TC-DT73	+++++	<i>Bacillus tequilenses</i>
TC-DT21	+++++	Ausente
TC-DT175	+++++	Não identificado
TC-DT193	+++++	Ausente
TC-DT248	+++++	Ausente
TC-DT82	+++++	Ausente
TC-DT113	+++++	Ausente

FIGURA 1A. Efeito inibitório de 92 isolados no crescimento do fitopatógeno, em teste *in vitro* (dupla-camada). imagem (A); Moderado +++ , ++ (4,00-2,01) , imagem B e Fraco + imagem C (2,00-0,5). Imagem D bactéria sem atividade inibitória.

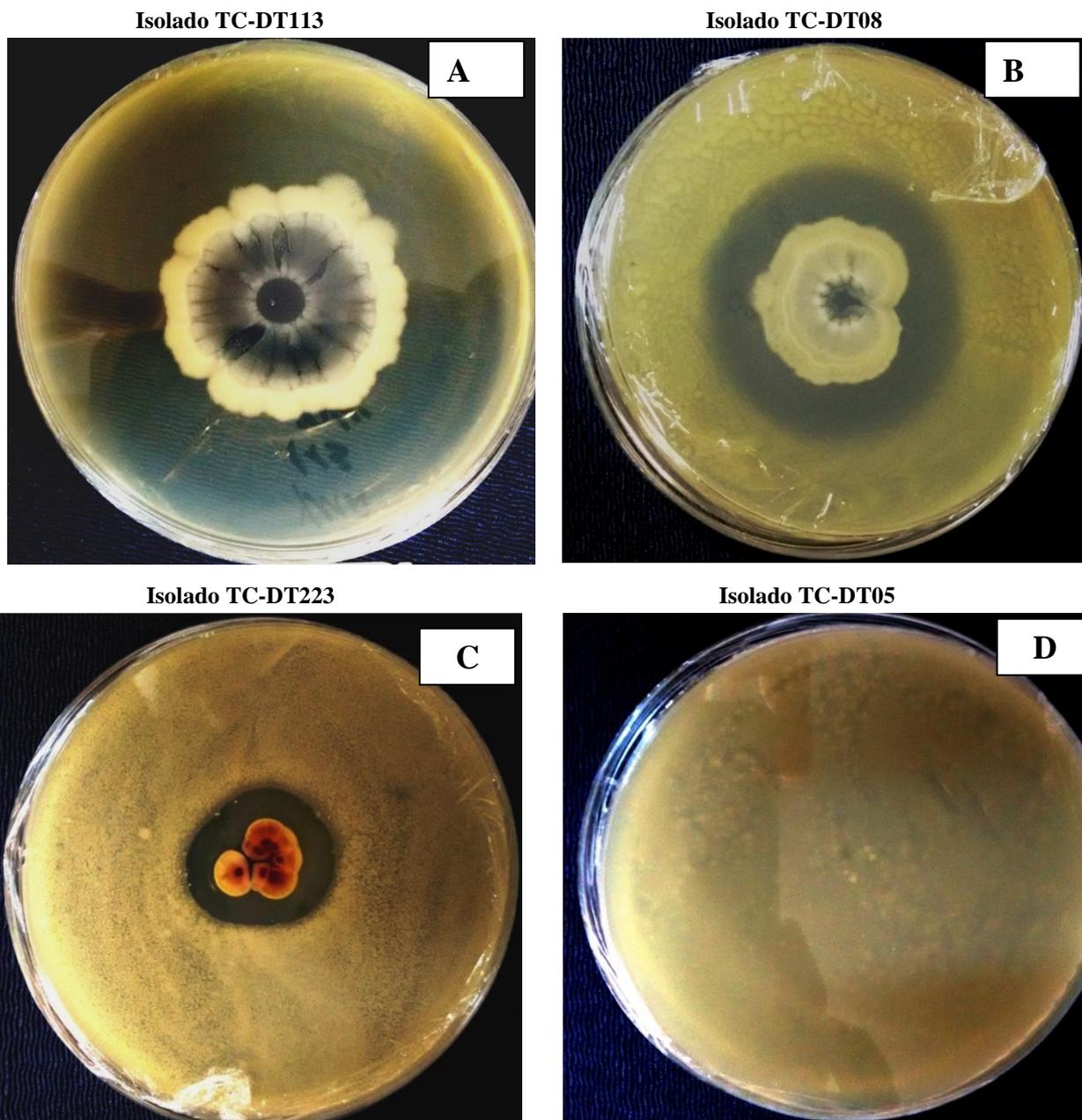


GRÁFICO 1A. Atividade antimicrobiana do filtrado extracelular bacteriano.

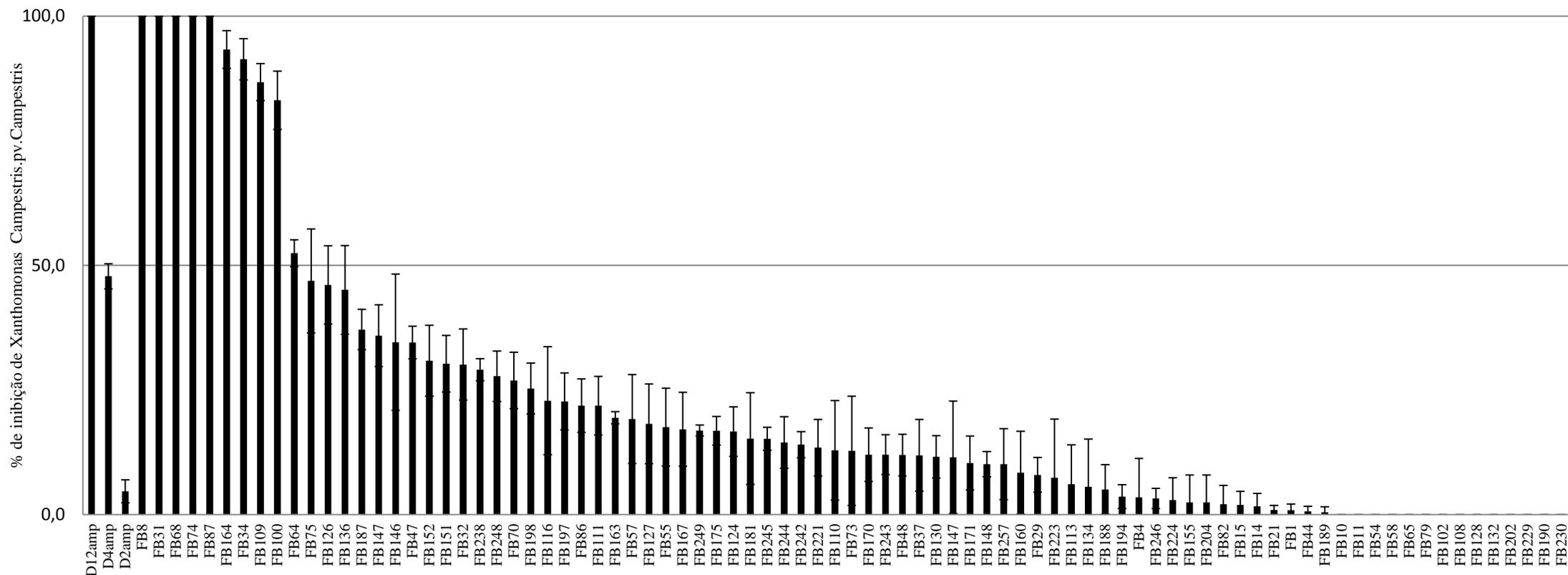


Gráfico 1A. Atividade antimicrobiana dos Filtrados extracelulares Bacterianos, de 92 isolados, sobre Xcc 629 IBSB. Teste realizado em meio líquido com microplaca de diluição. Amp= D 2, 4,12 µg/µl concentração de ampicilina, respectivamente

GRÁFICO 2A. Curva de crescimento de Xcc 629 IBSB

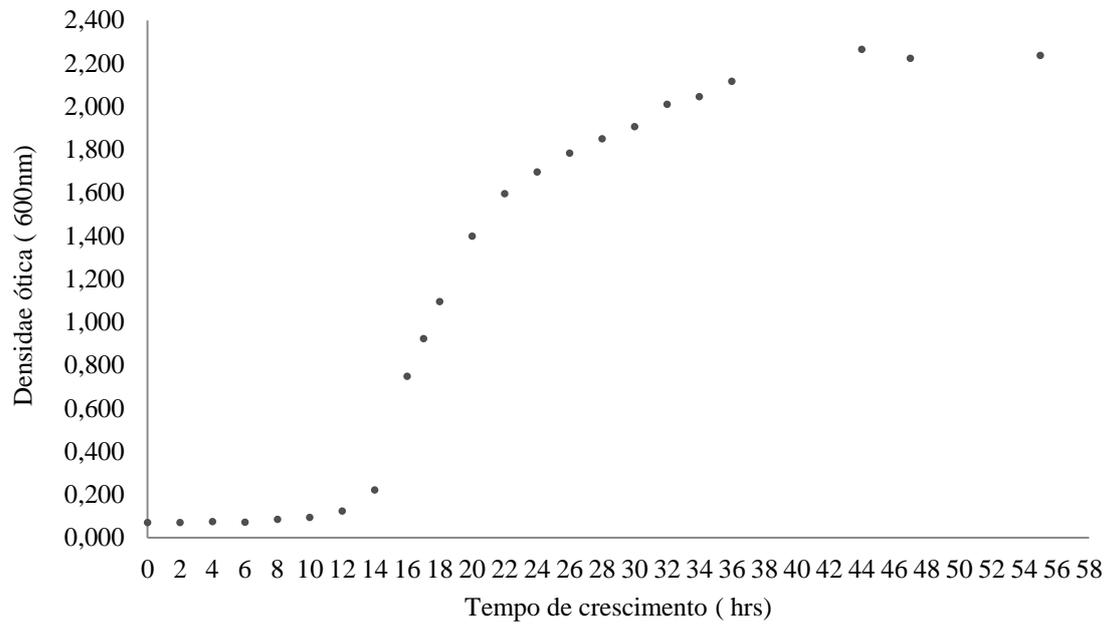
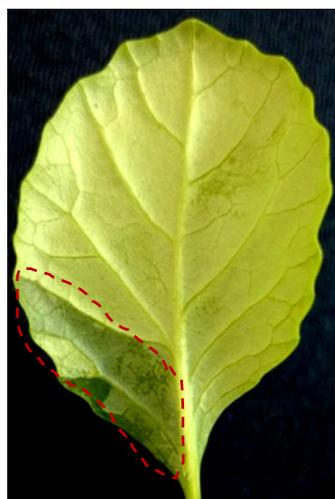


FIGURA 2A. Experimento in vivo, método de infiltração para : imagens (a): tratamento 2 FEB (DT-TC08) e fitopatógeno alvo (b) Tratamento 7: Meio YM liquido (c) Tratamento 7: FEB (TC-DT08) (d) Tratamento X21: Xcc (e) Casa de vegetação (f) Verso do Limbo.

Imagem a 2: FEB (DT-TC08) e fitopatógeno alvo.



Antes



Infiltração



Depois de 21 dias tratada

Imagem b: Meio YM liquido



Antes



Infiltração



Depois de 21 dias tratada

Imagem c: FEB (TC-DT08)



d) Tratamento X21: Xcc

Antes

Infiltração

Depois de 21 dias
tratada

Imagem d: X21: Xcc

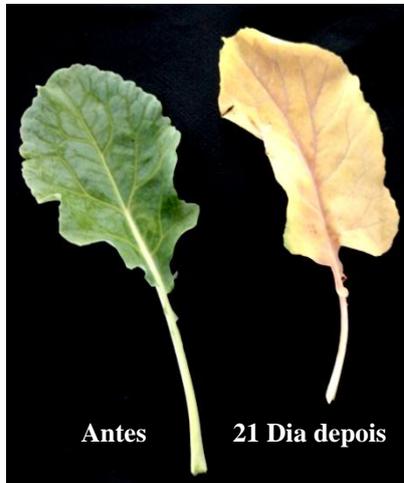


Imagem e: Casa de vegetação

Depois de 21 tratadas

Infiltração



Imagem f: Verso do Limbo. Efeito do FEB (TC-DT08) sobre a capacidade *X. Campestris* induzir sintomas de podridão Negra.(A) folha trata com *X. campestris*; (B) Folhas submetidas a tratamento com o FEB (TC-DT08) por um período de 21h; (C) Folhas não submetidas a qualquer tratamento; (D) Folhas tratadas somente com meio YM líquido, FEB (TC-DT08) e folhas tratadas com injeção de FEB (TC-DT08) em meio YM líquido.

