

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS BENÉFICAS PARA O BIOCONTROLE DA PODRIDÃO MOLE CAUSADA POR PECTOBACTERIUM SPP

**¹Fernanda Pereira da Silva, ¹Jadson Pinto Zorzal, ²Gracieli Lorenzoni Marotto,
¹Guilherme Lage Guimarães, ³Leandro Licursi de Oliveira, ¹André da Silva
Xavier.**

¹Universidade Estadual do Espírito Santo (campus de Alegre), Alto Universitário, S/N - Guararema, 29500-000 - Alegre – ES, Brasil. E-mail: fernanda_bio2010@hotmail.com, jadsonzp@gmail.com, guilherme.15.lage@gmail.com, xavierandre23@hotmail.com.

²Instituto Federal de Alegre (IFES de alegre), Rodovia ES-482 (Cachoeiro-Alegre, Km 72 - Rive, Alegre - ES, 29500-000. E-mail: gracielim18@gmail.com.

³Departamento de Biologia Geral — Universidade Federal de Viçosa. Av. Peter Henry Rolfs, S/N, Campus Universitário, 36570-000 — Viçosa/MG, Brasil. E-mail: leandro.licursi@ufv.br.

Resumo

Pectobacterium spp. são bactérias fitopatogênicas que infectam diversas famílias olerícolas causando a podridão mole. A patogênese da doença está associada a ação de enzima pectinolíticas que degradam o tecido vegetal, gerando perdas durante as fases de colheita e comercialização. O controle de *Pectobacterium spp.* na lavoura é considerado complexo e está relacionado a medidas preventivas e adoção de tratamentos culturais. Assim, estratégias alternativas de controle são demandadas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar a prospecção de bactérias benéficas depositadas no acervo do BIOTA/UFES, por meio de ensaios do pocinho em placas de Petri, capazes de inibir o crescimento de *Pectobacterium spp.* para aplicação no controle da podridão mole. Os resultados obtidos revelaram que dos 10 isolados avaliados, 7 apresentaram atividade antagonista contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (código PCC19), sendo 6 delas sequenciadas e classificadas no gênero *Bacillus spp.* O experimento se encontra em andamento e será concluído após a identificação dos isolados ao nível de espécie, caracterização do composto antimicrobiano, testes *in vivo* e produção de formulações.

Palavras-chave: Fitossanidade, antagonismo, controle biológico, isolamento bacteriano, fitobactérias

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas; Microbiologia.

Introdução

A olericultura é o ramo da horticultura que abrange a exploração de um grande número de espécie de plantas, habitualmente conhecidas como hortaliças e que podem ser constituídas por: folhas, inflorescências, raízes, caules e frutos (Gomes et al., 2016). Trata-se de uma atividade que tem uma grande relação com a agricultura de base familiar, sendo uma importante geradora de renda (Bezerra and Schlindwein, 2017).

Inúmeros fatores podem contribuir com a queda na produtividade das olerícolas (Carstens et al., 2018), dentre eles destaca-se doenças bacterianas como a podridão mole causada por bactérias pectinolíticas, que são patógenos radiculares como as do gênero *Pectobacterium*. Essas bactérias possuem um grupo de enzimas degradadoras de parede celular (Bell et al., 2004) que, dependendo do tipo do vegetal, induzem sintomas de murcha, podridão mole, canela preta, talo-oco e tombamento de plântulas (Mariano et al., 2005) se destacando na lista das “Top 10” bactérias com base na importância científica e econômica para agricultura (Mansfield et al., 2012).

Pectobacterium spp. sobrevivem epifiticamente na filosfera de plantas hospedeiras, como saprófitas no solo, em restos culturais infectados, em material de plantio, em associação com ervas daninhas ou na rizosfera de plantas cultivadas, sendo essas as principais fontes de inóculo primário destas bactérias, assim como a água de irrigação e águas das chuvas (Czajkowski et al., 2011, 2015; Nabhan et al., 2012). O controle de *Pectobacterium spp.* no campo é complexo e normalmente envolve o uso de sementes tratadas, eliminação de restos de cultura, desinfecção de ferramentas e maquinarias,

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

tratamento da água de irrigação e rotação de cultura (Silva 2006). Assim, medidas alternativas e eficazes de controle são necessárias. Assim, o presente trabalho tem como objetivo realizar a prospecção de isolados bacterianos com potencial antagonico para o controle sustentável da podridão mole causada por *Pectobacterium* spp.

Metodologia

Os isolados bacterianos avaliados neste estudo foram coletados e purificados a partir de diferentes substratos e subsequentemente depositados em períodos distintos no acervo bacteriológico do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Agrícola (BIOTA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus de Alegre, conforme descrito na tabela 1. Previamente aos ensaios, as bactérias criopreservadas foram reativadas em meio de cultura ágar nutriente e incubadas à 28 °C por 24h e 48h. Em seguida uma suspensão de células foi inoculada em 50 mL de caldo nutriente e mantida *overnight* em incubadora tipo *shaker* regulada para a condição de 28 °C ± 2°C e 180 rpm.

O ensaio para avaliação do potencial antagonista foi realizado utilizando como tratamentos os isolados listados na tabela 1. Para tanto, placas de Petri foram preparadas pelo método *pour plate* adicionando-se 25 mL de ágar nutriente fundente e 2 mL da suspensão de *Pectobacterium* spp., ajustada para $DO_{600nm}=0,2$. Em seguida, foram realizados cinco furos (pocinho) em cada placa com auxílio de um furador com diâmetro de 6,35 mm. Aliquotas de 20 µL de cada da isolado bacteriano, previamente incubado como descrito no passo anterior, foram adicionadas nos pocinhos, totalizando 8 repetições por isolado para seleção de cepas antagonistas. Para controle negativo, o mesmo procedimento foi realizado em todas as placas, sendo adicionado caldo nutriente em substituição à suspensão bacteriana. As placas foram incubadas em estufa incubadora BOD, com temperatura regulada para 28 °C. Depois de 24 horas de inoculação (24h dpi) as leituras dos halos de inibição foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital e lupa estereoscópica.

Amplificação do gene 16s rDNA, foi realizada a partir da extração de DNA de colônias puras. Os isolados foram suspensos em 120 µL de água ultrapura e fervidas a 95°C por 10 min para exposição do material genético, segundo a metodologia proposta por Junior (2016) e Dashti (2009). As regiões conservadas do rDNA 16S foram amplificadas em PCR utilizando os primers 341F (CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG) e 785R (CCTATCCCCTGTGTGCCCTTGGCAGTCTCAG), desenhados por Klindworth (2013). As reações foram realizadas em um volume de 20 µL, contendo 11 µL de água ultrapura, 1 µL do primer 341F a 10 µM, 1µL de primer 785R a 10 µM, 3 µL da suspensão fervida de colônias e 4µL de 5X HOT FirePol MasterMix 12.5 µM (Solis BioDyne). O termociclador foi programado para a seguinte ciclagem: Um passo adicional de ativação da enzima a 95°C por 15 minutos; 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 53°C e 1 minuto a 72°C; um passo final de extensão de 10 minutos a 72°C. Após as reações de PCR, a integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% nas proporções de componentes (5µL das reações + 1µL de GelRed 1:100 +1µL de 6x loading dye + 3µL de água ultrapura) e a corrida em TAE 0,5X a 100V e 400mA por 50 minutos. As amostras foram verificadas sob transiluminação UV (254 nm) para avaliação dos produtos do PCR esperado de 464 pb.

O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado segundo o método de Sanger (SANGER et al., 1977) no Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV/Viçosa-MG), em sequenciador ABI PRISM 3100. As sequências obtidas foram analisadas no *Geneious* prime versão 2022.2.2 e submetidas na plataforma *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul, 1990), para comparação das sequencias constantes na base de dados do NCBI (2023).

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Tabela 1 - Descrição dos isolados bacterianos avaliados no ensaio de antagonismos contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PCC19).

Isolado (Código)	Substrato	Local de coleta	Coordenada geográficas	informações adicionais	Acervo
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (PCC19)	***	***	***	Gentilmente cedidos pela Coleção de Cultura Rosa Mariano (CCRM), UFRPE	CCRM/UFRPE
Placa 5	Folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomateiro)	Alegre/ES	20°45'3,45"S 41°29'13,56"O	Epífita, infectário	BIOTA/UFES
Placa 6	Folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomateiro)	Alegre/ES	20°45'3,45"S 41°29'13,56"O	Epífita, infectário	BIOTA/UFES
<i>Bacillus</i>	Folhas de <i>Prunus dulcis</i> (Amendoeira)	Cachoeiro do Itapemerim/ES	***	Sítio do Pro ^o Fábio - Cód. Foto M022-456	BIOTA/UFES
ANL-3	Líquens	Alegre/ES	20°45'42,901"S 41°32'13,0452"O	Tela de proteção - Casa de vegetação, Prof. Dirceu	BIOTA/UFES
A1R.33	Raiz de <i>S. grisebachii</i> (Agriãozinho)	Alegre/ES	20°45'20"S 41°27'4" O	***	BIOTA/UFES
SS1.1	Escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Alegre/ES	20° 45' 14" S 42° 52' 53" W	Isoladas de escleródios que vieram da UFV-Viçosa	BIOTA/UFES
SS2.1	Escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Alegre/ES	21° 45' 14" S 42° 52' 53" W	Isoladas de escleródios que vieram da UFV-Viçosa	BIOTA/UFES
SS2.2	Escleródio de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Alegre/ES	22° 45' 14" S 42° 52' 53" W	Isoladas de escleródios que vieram da UFV-Viçosa	BIOTA/UFES
PiR21	Raiz de <i>Piper aduncum</i> (Pimenta do reino)	Alegre/ES	***	Bactéria produz pigmento verde e cheiro refrescante	BIOTA/UFES
A1F.2	Folhas de <i>S. grisebachii</i> (Agriãozinho)	Alegre/ES	20°45'20"S 41°27'4" O	***	BIOTA/UFES

Fonte: o autor.

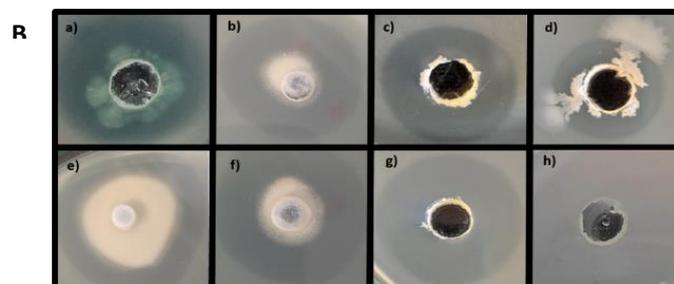
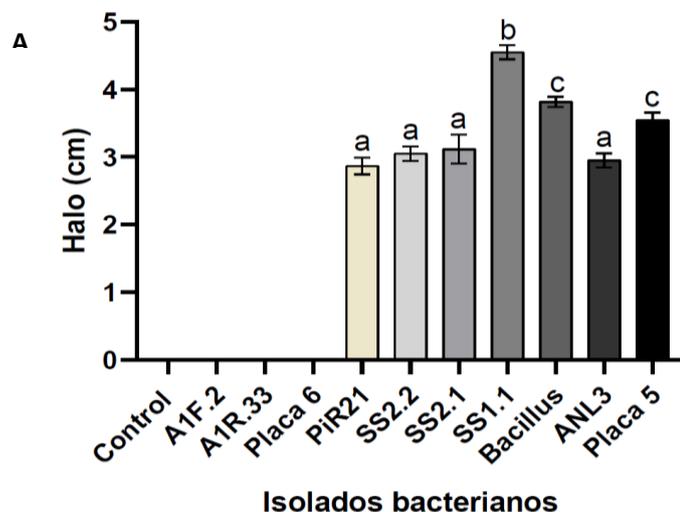
Resultados

Neste trabalho foi realizado a seleção de 10 isolados bacterianos a partir do acervo bacteriológico do BIOTA/UFES, para avaliação da atividade antagônica contra o crescimento de *Pectobacterium*

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

carotovorum subsp. *carotovorum* (código PCC19). Após ensaio em placa de Petri, observou-se que sete dos dez isolados desafiados, foram capazes de inibir o crescimento de PCC19, formando halo de inibição que variou de acordo com o isolado analisado (Figura 1). Os isolados com os códigos A1F.2, A1R.33 e Placa 6 não apresentaram antagonismo neste desafio. Todos os isolados com atividade antagônica formaram halo de inibição maior que 2 cm, se destacando os isolados SS1.1, *Bacillus* e Placa 5 que foram significativos em relação aos demais ($p < 0,05$). O fenótipo dos halos de inibição foi típico para cada isolado testado, sendo que alguns apresentaram competitividade de espaço e atividade inibitória contra PCC19 (Ex. SS1.1 e PiR21), enquanto outros apenas ação inibitória (Ex. SS2.2 e Placa 5). Os isolados positivos para atividade antagônica, foram selecionados e utilizados para amplificação por PCR usando o marcador universal rDNA 16S. Os amplicons foram obtidos em diferentes temperaturas de anelamento (53 °C - 63 °C) e apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 464 pb (Figura 2), sendo submetidos ao sequenciamento. Todas as sequencias mostraram score com alta qualidade, exceto o isolado PiR21, que será sequenciado novamente.

Figura 1 – Avaliação da atividade antagônica dos isolados bacterianos testados no crescimento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PCC19). A) Medição dos halos de inibição 24h dpi; (B) Fenótipo dos halos de inibição das bactérias com atividade antagônica. Legenda: a) PiR21; b) *Bacillus*; c) Placa 5; d) ANL-3; e) SS1.1; f) SS2.1; g) SS2.2; h) Controle com caldo nutriente.

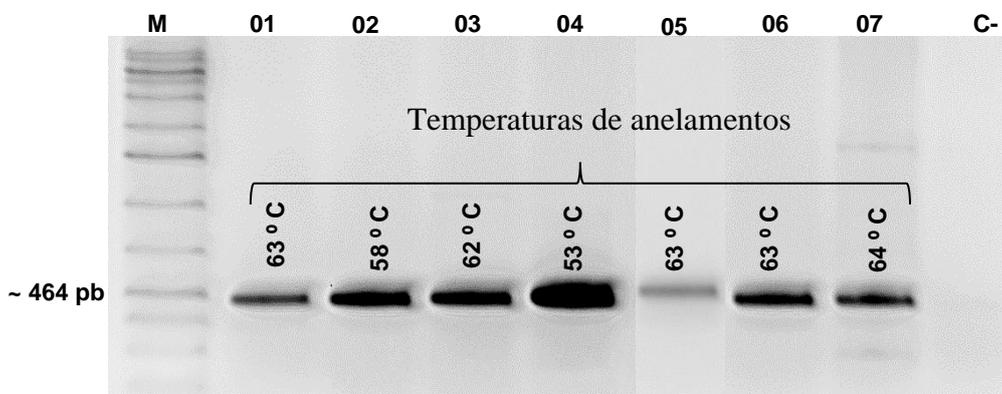


Fonte: o autor.

Após as análises da qualidade e trimagem das sequencias, os *contigs* gerados foram submetidos na plataforma *BLASTn* (NCBI) para comparação das sequencias de nucleotídeos frente as sequencias depositadas no banco de dados do NCBI (2023). Os resultados mostraram que os seis isolados bacterianos possuem similaridade com espécies do gênero *Bacillus* (Tabela 2), contudo, não foi possível fazer a distinção entre as espécies, sendo necessário o uso de marcadores *housekeeping* específicos para obter melhor resolução da classificação dos mesmos.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2 - Gel de eletroforese da PCR dos 07 isolados bacterianos com atividade antagonista contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PCC19), utilizando marcadores molecular 16S rDNA sob diferentes temperaturas de anelamento. Legenda: M-Marcador Ladder (1Kb); 01- Placa 05; 02- ANL-3; 3- *Bacillus*; 4-SS1.1; 5-SS2.1; 6-SS2.2; 7- PiR21. Amplicon possui aproximadamente 464 pb.



Fonte: o autor.

Tabela 2 - Resultado da análise no BLASTn-NCBI dos contigs gerados a partir das sequências obtidas no sequenciamento *shotgun* com 16S rDNA.

Isolado (Código)	Descrição no BLAST-NCBI	Nome científico	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Placa 05	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain 64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp.	97%	1,00E-146	93.37%	MN160506.1
	<i>Bacillus velezensis</i> strain B157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	2,00E-33	96.63%	OP555715.1
ANL-3	<i>Bacillus velezensis</i> strain B157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	2,00E-71	96.34%	OP555715.1
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus velezensis</i> strain B157 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus velezensis</i>	100%	2,00E-153	100.00%	OP555715.1
SS1.1	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain GSTU12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp.	99%	0.0	99.14%	MT071490.1
SS2.1	<i>Bacillus</i> sp. (in: Bacteria) strain 64 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<i>Bacillus</i> sp.	100%	0.0	98.25%	MN160506.1
SS2.2	Repetir sequenciamento	***	***	***	***	***
PiR.21						

Fonte: o autor.

Discussão

O antagonismo é realizado naturalmente por algumas bactérias no meio ambiente pela ação de compostos antimicrobianos que resulta na inibição do crescimento garantindo vantagens adaptativas entre duas espécies que competem em um mesmo habitat (Amer et al., 2021). Neste trabalho foram identificados sete isolados bacterianos, com atividade antagonista capazes de inibir o crescimento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PCC19) demonstrando o potencial desses isolados para o controle da murcha bacteriana. É importante mencionar que esses isolados foram coletados em

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

diferentes substratos, períodos e localizações distintas, revelando a diversidade microbiana existente no ambiente com potencial para aplicações biotecnológicas e fitossanitárias.

A atividade antagonista pode ocorrer pela ação de metabólitos secundários, peptídeos antimicrobianos, proteínas, enzimas ou pigmentos produzidos pelos microrganismos (Ghai and Jain, 2007; Rao et al., 2017). O mecanismo da atividade antimicrobiana dos sete isolados avaliados neste estudo se encontra em avaliação (experimentos em andamento) para melhor entendimento do princípio ativo e manipulação dos mesmos para possível utilização como bioestimulantes e bioprotetores.

Muitos microrganismos produzem pigmentos que podem atuar na inibição do crescimento microbiano (Rao et al., 2017). Interessantemente, foi observado que o isolado com o código Pir21 produz pigmento verde no meio de cultura e perfume refrescante que pode estar relacionado com a atividade antagonista. Contudo, essas características ainda estão sob investigação (experimento em andamento).

Usando o marcador universal rDNA 16S foi possível realizar a classificação de seis no gênero *Bacillus*, sendo sugerido o uso de marcadores específicos como *phoP*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoB*, *aroE*, *multL*, *trpB* (Guo et al., 2012; Liu et al., 2013; Yu et al., 2017; Liu et al., 2022), para identificação ao nível de espécies. Essa informação está coerente com a literatura, visto que *Bacillus* spp, é um gênero conhecido por inibir o crescimento de alguns fungos e bactérias e tem sido utilizado em formulações como bioestimulantes e no biocontrole de microrganismos patogênicos de plantas (Caulier et al., 2018).

A identificação dos compostos ativos desses isolados permeará a elaboração de estratégias para a produção de formulações para aplicações nas culturas a campo e em fase de comercialização, visando a redução das perdas e prejuízos causados pela podridão mole por *Pectobacterium* spp.

Conclusão

Neste trabalho foi possível identificar sete isolados bacterianos capazes de inibir o crescimento de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PCC19), dos quais seis foram classificados no gênero *Bacillus*. Esses representam uma potencial estratégia agroecológica para o controle da podridão mole.

Referências

- Gomes, Gisely P., Leandro SA Gonçalves, Alline Sekyia, Milena P. Euzebio, Renata P. Robaina, and Caillet D. Marinho. 2016. "Registro e Proteção de Olerícolas no Brasil, Período de 1998 a 2014." Horticultura Brasileira.
- Mansfield, John, Stephane Genin, Shimpei Magori, Vitaly Citovsky, Malinee Sriariyanum, Pamela Ronald, Max Dow, Valérie Verdier, Steven V. Beer, Marcos A. Machado, Ian Toth, George Salmond, and Gary D. Foster. 2012. "Top 10 Plant Pathogenic Bacteria in Molecular Plant Pathology." Molecular Plant Pathology.
- Czajkowski, R., M. C. M. Pérombelon, S. Jafra, E. Lojkowska, M. Potrykus, J. M. Van Der Wolf, and W. Sledz. 2015. "Detection, Identification and Differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Causing Potato Blackleg and Tuber Soft Rot: A Review." Annals of Applied Biology.
- Czajkowski, R., M. C. M. Pérombelon, J. A. Van Veen, and J. M. Van der Wolf. 2011. "Control of Blackleg and Tuber Soft Rot of Potato Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species: A Review." Plant Pathology.
- Nabhan, S., S. H. De Boer, E. Maiss, and K. Wydra. 2012. "Taxonomic Relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*." Journal of Applied Microbiology.
- Caulier, S., Gillis, A., Colau, G., Licciardi, F., Liépin, M., Desoignies, N., ... & Bragard, C. 2018. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 143.

Agradecimentos

Ao Centro de Ciências Agrárias Engenharias e ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI) da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, nas dependências dos quais os experimentos ocorreram, bem como o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.