

## INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS BIOCONTROLADORAS E NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

**JULIA PELEGREINELI FASOLIN<sup>1</sup>; RENATA MOCCELLIN<sup>2</sup>; MAURÍCIO SANGIOGO<sup>2</sup>; FÁTIMA GIOVANA TESSMER SANTIN<sup>2</sup>; DANIELA CARNEIRO<sup>2</sup>; ANDREA BITTENCOURT MOURA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – julia\_pelegreineli@hotmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – renata.moccellin@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – abmoura@ufpel.edu.br*

### 1. INTRODUÇÃO

Durante anos de pesquisa o grupo de bacteriologia vegetal coordenado pela Universidade Federal de Pelotas, selecionou bactérias eficientes no biocontrole de doenças do feijão (ZANATTA, 2007; CORRÊA, 2014).

Sabe-se que o ambiente pode influenciar o desenvolvimento dos microrganismos e as interações entre eles, porém, até o momento a literatura traz poucas informações sobre os efeitos das mudanças climáticas em relação ao controle biológico de doenças de plantas. Atualmente, têm crescido as preocupações com o impacto das mudanças climáticas sobre os ecossistemas. Nos últimos anos a concentração de dióxido de carbono na atmosfera aumentou significativamente (LÜTHI et al., 2008), e a destruição da camada de ozônio na estratosfera resultou no aumento da radiação ultravioleta-B que atinge a superfície do planeta (PAUL, 2000), estes fatores colaboram para o aumento da temperatura global.

Neste contexto, este estudo tem como objetivo avaliar por meio de estudos *in vitro*, o desenvolvimento e a capacidade de produção de enzimas relacionadas ao biocontrole de bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de doenças da cultura do feijão, sob diferentes condições de temperatura.

### 2. METODOLOGIA

O ensaio foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Pelotas, sendo conduzido em delineamento interiamente casualizado, com cinco repetições. Foram utilizados oito isolados biocontroladores adquiridos do banco de isolados do laboratório, DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*P. fluorescens*; DFs842-*P. fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus fasciens*; DFs912-*R. fasciens*. Os biocontradores foram testados, sob diferentes condições de temperatura: 17 °C, 22 °C, 27 °C, 32 °C e 37 °C.

Para a capacidade de produção de enzimas, relacionadas ao biocontrole, testou-se a hidrólise de carboidrato, proteína e lipídio, por meio do uso de meios específicos: quitina (CATTELAN, 1999), caseína (MARIANO; SILVEIRA, 2005) e lecitina (SCHAAD et al., 2001), respectivamente. Os isolados foram repicados em “spots” e em cada placa foi adicionado uma bactéria com atividade positiva e outra negativa como controles, as placas foram mantidas em incubadora do tipo BOD sob as cinco temperaturas. A avaliação foi qualitativa, baseada na alteração do meio formando halo de degradação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na faixa de temperatura entre 17 e 32 °C todas as bactérias se desenvolveram, porém, a 37°C somente as bactérias do gênero *Bacillus* formaram colônias. Algumas bactérias possuem redes adaptativas para enfrentar os desafios de mudança de ambiente e sobreviver sob condições de estresse (ABEE; WOUTERS, 1999). Um exemplo de resposta adaptativa pode ser observado para *B. cereus*, onde um tratamento com dose de calor não-letal inicial pode induzir resistência transitória para um posterior tratamento térmico (com temperatura letal), fenômeno conhecido como termotolerância (PERIAGO et al., 2002). Esse gênero bacteriano possui ainda capacidade de formar endósporos, que conferem vantagem para sobrevivência, ponderando resistir à altas temperaturas, dessecamento e ação de radiação (ABRIQUEL et al., 2011). Estas características são interessantes para que o biocontrolador persista no filoplano ou no solo mesmo sob condições adversas.

Em relação à capacidade dos isolados em produzir enzimas hidrolíticas, observou-se que apenas seis possuem essa capacidade (Tabela 1). Os isolados do gênero *Bacillus* (DFs93, DFs348 e DFs769) mostram maior diversidade de compostos envolvidos com controle biológico, com capacidade para hidrolisar todos os componentes estudados. Este gênero já é estudado há muito tempo como agente de controle biológico devido à sua capacidade de sintetizar diversos compostos antimicrobianos (ARGUELLES-ARIAS et al., 2009).

Tabela 1 – Caracterização biológica de isolados biocontroladores em função da produção de compostos relacionados ao biocontrole sob influência da temperatura.

Isolado	Quitina <sup>1</sup>						Caseína <sup>1</sup>						Lecitina <sup>1</sup>					
	Temperatura °C																	
	17	22	27	32	37	17	22	27	32	37	17	22	27	32	37	17	22	37
DFs093	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DFs348	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
DFs513	-	-	-	-	0	+	+	+	-	0	+	+	+	+	+	+	+	0
DFs769	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DFs831	-	-	-	-	0	+	+	+	-	0	-	-	+	+	+	+	+	0
DFs842	-	-	-	-	0	+	+	+	+	0	-	-	-	-	-	-	-	0
DFs843	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
DFs912	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	0
Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>1</sup>Avaliações qualitativas, resultados expressos como positivos (+) ou negativos (-); 0: Bactérias que não se desenvolveram nas respectivas temperaturas.

Microrganismos que produzem quitinases podem inibir o crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos, uma vez que quitinases apresentam a capacidade de ataque direto à parede celular de fungos, portanto, é dado atenção a estas enzimas no controle biológico (BRZEZINSKA et al., 2014; GOHEL et al., 2006).

As atividades proteolíticas e lipolíticas também são importantes mecanismos, alguns estudos mostram que a superprodução de proteases resulta em melhoria na eficácia do controle biológico de fungos (DUNNE et al., 2000). A proteólise também tem sido considerada importante no controle biológico de nematóides (KHAN et al., 2005), pesquisas associaram a atuação destas enzimas sobre membranas de ovos e da cutícula de formas móveis de diferentes espécies de

nematoides (PADGHAM; SIKORA, 2007). Atividades lipolíticas também foram associadas ao controle de fitonematoídes (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993).

De modo geral, a temperatura teve pouca influência na capacidade hidrolítica dos isolados, exceto para DFs348, onde na temperatura de 17°C a hidrólise de quitina e lecitina foram inibidas, para DFs513, o qual a temperatura de 32°C inibiu a capacidade de hidrólise de caseína, e para DFs831, que também teve a capacidade de hidrólise da caseína inibida sob 32°C, e para lecitina em temperaturas mais amenas, 17 e 22°C, isto pode estar relacionado com a temperatura ótima para a produção destas enzimas pelas bactérias.

Ainda há poucos estudos relacionando temperatura e a produção e atividade destas enzimas bacterianas. He et al. (2003), otimizaram as condições de cultivo *in vitro* para a produção de enzima com atividade lítica (Beta-glucanase) por *Bacillus subtilis*, em seus estudos a temperatura apresentou grande efeito na produção da enzima, sendo a temperatura ótima para a produção de 37°C, sendo que a atividade diminuiu significativamente quando se utilizaram temperaturas superiores a esta. Hjort et al. (2014) trabalhando com mutantes contendo um gene quitinase da família 18A, determinou a temperatura de 35°C como ótima para sua atividade.

#### 4. CONCLUSÕES

Estes resultados instigam a continuação do estudo da capacidade dos biocontroladores sob variações ambientais, o qual é importante para selecionar isolados com maior capacidade adaptativa, que persistam à campo e dê maior sustentação ao controle biológico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal in Food Microbiology*, v.50, p.65–91, 1999.
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M.A.P.; BEN OMAR, N.; GALVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, v.35, p.201–232, 2011.
- ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, v.8, n.63, 2009.
- BRZEZINSKA, M.S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; M. WALCZAK. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection, *Current Microbiology*, v.68, p.71-81, 2014.
- CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Documentos 139).
- CORRÊA, B. O.; SCHÄFER, J. T.; MOURA, A. B. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean. *Biological Control*, v.72, 71-75, 2014.

DUNNE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; BRUIJN, F.J.; O'GARA, F. Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81, **Microbiology**, v.146, p.2069–2078, 2000.

GOHEL V.; SINGH A.; VIMAL M.; ASHWINI P.; CHHATPAR H.S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal Biotechnology**, v.5 p.54-72, 2006.

HE, G.Q.; TANG, X.J.; MUKHTAR, A.M.; CHEN, Q.H. Optimization of cultural conditions for thermostable beta-1,3-1,4-glucanase production by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5. **Journal of Zhejiang University Science, Hangzhou**, v.4, n.6, p.719, 2003.

HJORT, K.; PRESTI, I.; ELVÄNG, A.; MARINELLI, F.; SJÖLING, S. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.2819–2828, 2014.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecolomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Melodogyne javanica* juveniles. **Biological control**, v. 31, p. 346-352, 2005.

LÜTHI, D.; FLOCH, M. L.; BEREITER, B.; BLUNIER, T.; BARNOLA, J.-M.; SIEGENTHALER, U.; RAYNAUD, D.; JOUZEL, J.; FISCHER, H.; KAWAMURA, K.; STOCKER, T. F. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. **Nature**, v. 453, p. 379-382, 2008.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2 ed. Recife: UFRP, 2005, 184p.

PADGHAM, J.L.; SIKORA, J.L. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, v.26, p.971-977, 2007.

PAUL, N. D. Stratospheric ozone depletion, UV-B radiation and crop disease. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 343-355, 2000.

PERIAGO, P.M.; SCHAIK, W.V.; ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3486–3495, 2002.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. Saint Paul: The American Phytopathology Society, 2001, 373 p.

WESTCOTT, S.W.; KLUEPFEL, D. Inhibition of *Cricconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, v.83, p.1245-1249, 1993.

ZANATTA, Z.G.C.N.; MOURA, A.B.; MAIA, L.C.; SANTOS, A.S. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 511-515, 2007.