

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

**CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA-AQUOSA DO MELÃO
CAUSADA POR *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***

Elizama Roza dos Santos

Recife – 2004

Elizama Roza do Santos

**CONTROLE BIOLÓGICO DA MANCHA-AQUOSA DO MELÃO
CAUSADA POR *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM BIOTECNOLOGIA.

Área de concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadores: Profa.Dra. Ana Maria Souto Maior

Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia

Recife – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *ELIZAMA ROZA DOS SANTOS* AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 27 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:

Dra. ALDA DE ANDRADE CHIAPPETA
Departamento de Antibióticos - UFPE

Dra. GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS
Departamento de Antibióticos - UFPE

Dra. ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO
Departamento de Fitossanidade - UFRPE

“Deus, tu me cercas em volta e colocas sobre mim a tua mão. Tal ciência é para mim maravilhosíssima; tão alta que não a posso atingir. Se eu tomar as asas da alva, se habitar nas extremidades do mar, até ali a tua mão me guiará e tua destra me susterá”.

Obrigada, Senhor, por estares comigo em todos os momentos.

DEDICO

À minha mãe, Lídia, e ao meu pai Antônio (*In Memoriam*), pelos princípios morais que me outorgaram. À minha irmã Loide, ao meu marido Valdeci e à minha filha Priscila, pelo apoio e incentivo que sempre me deram para o aperfeiçoamento da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Maria Souto Maior e à Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia, pela orientação, dedicação e amizade, colaborando no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela valiosa contribuição neste trabalho.

A todos os professores do mestrado, em especial à Profa. Dra. Alda Chiappeta, à Profa. Dra. Glícia Calazans e à Profa. Dra. Janete Magali de Araújo, por todo estímulo e amizade

Aos colegas do mestrado, especialmente Sibeles e João, pela amizade e companheirismo.

Às estagiárias, Ivanise, Gleyce e Emanuelle, pela amizade e ajuda no decorrer deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Orlando, Clécia, Fátima, Manuel, Zeca e Luís Carlos, que contribuíram na realização deste trabalho.

À secretária do Mestrado, Sueli, pela atenção e paciência durante todo curso.

Aos meus irmãos, que de forma indireta contribuíram na realização deste trabalho.

Aos amigos Daniel Gouveia, Edson Valença, Josabete Silva e Silvana Almeida, pela ajuda dispensada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Controle Biológico	5
2.2 Mancha Aquosa do Melão	11
2.2.1 Características gerais da doença	11
2.2.2 <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	15
2.3 Utilização de <i>Bacillus</i> spp. no Controle de Fitopatógenos	16
2.3.1 Produção de lipopeptídeos por <i>Bacillus</i> spp.	18
2.3.2 Aplicações de lipopeptídeos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Microrganismos	21
3.2 Meios de Cultura	21
3.2.1 Meios para manutenção e reativação das linhagens	21
3.2.2 Meios para reativação e manutenção do fitopatógeno	22
3.2.3 Meio de fermentação	22
3.2.4 Meio para determinação da atividade hemolítica	23
3.3 Métodos Analíticos	23
3.3.1 Atividade hemolítica	23
3.3.2 Atividade antimicrobiana	24
3.3.3 Concentração de biomassa	24
3.3.4 Concentração de glicose	24
3.3.5 Produção de biossurfactante	25
3.3.6 Separação parcial de compostos bioativos	25
3.4 Cultivos em Frascos Agitados	25
3.5 Avaliação do Controle do Fitopatógeno <i>in vivo</i>	26
3.5.1 Inoculação de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	

em sementes de melão	26
3.5.2 Bacterização das sementes	27
3.5.3 Semeio e emergência das plântulas	27
3.5.4 Avaliação das plantas	29
3.5.5 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	31
4.1.1 Avaliação através de cultivo em meio sólido	31
4.1.2 Avaliação através de cultivo em meio líquido	32
4.2 Controle Biológico da Mancha Aquosa do Melão <i>in vivo</i>	36
4.3 Caracterização dos Compostos Bioativos	44
4.3.1 Atividade hemolítica	44
4.3.2 Atividade antimicrobiana dos compostos hemolíticos	46
4.3.3 Atividade surfactante em meio líquido	47
5. CONCLUSÕES	51
6. SUGESTÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mancha aquosa do melão: (A) Sintomas iniciais da doença; (B) Sintomas avançados da doença; (C) Podridão interna do fruto	14
Figura 2.2 - Estrutura química do lipopeptídeo surfactina, produzido por <i>Bacillus subtilis</i>	18
Figura 3.1 - Esquema da inoculação do fitopatógeno nas sementes através do método de infiltração a vácuo	27
Figura 3.2 - Semeio e emergência das plântulas	28
Figura 3.3 - Escala de notas, utilizada na avaliação da severidade	30
Figura 4.1 - Halos de inibição do crescimento de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , formados pelo líquido fermentado, após 72 horas de cultivo de (1) <i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7, (2) <i>B. subtilis</i> R14, (3) <i>B. megaterium</i> C116 e (4) <i>Bacillus</i> sp. MEN2	34
Figura 4.2 – Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>Bacillus subtilis</i> R14, contendo células (testemunha do lado esquerdo)	40
Figura 4.3 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>Bacillus subtilis</i> R14, sem células (testemunha do lado esquerdo)	40

Figura 4.4 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7, contendo células (testemunha do lado esquerdo)	41
Figura 4.5 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7, sem células (testemunha do lado esquerdo)	41
Figura 4.6 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>B. megaterium</i> C116, contendo células (testemunha do lado esquerdo)	42
Figura 4.7 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>B. megaterium</i> C116, sem células (testemunha do lado esquerdo)	42
Figura 4.8 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>Bacillus</i> sp. MEN 2, contendo células (testemunha do lado esquerdo)	43
Figura 4.9 - Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de <i>Bacillus</i> sp. MEN 2, sem células (testemunha do lado esquerdo)	43
Figura 4.10 - Atividade hemolítica de (no sentido horário, a partir do quadrante esquerdo superior): <i>B. subtilis</i> R14, <i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> Rab7, <i>Bacillus</i> sp. MEN2 e <i>B. megaterium</i> C116	45
Figura 4.11 - Atividade antimicrobiana de compostos bioativos presentes nas zonas de hemólises, produzidas por (no sentido horário, a partir do quadrante esquerdo superior): <i>B. subtilis</i> R14; <i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7; <i>Bacillus</i> sp. MEN2 e <i>B. megaterium</i> C116	47

Figura 4.12 - Aspecto do fermentado, após 72 horas do cultivo de (no sentido horário, a partir do quadrante esquerdo superior): *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116, *B. subtilis* R14 e *Bacillus* sp. MEN2

49

Figura 4.13 - Comparação entre a tensão superficial da água pura antes e após solubilização de precipitado ácido, obtido após 72 horas de fermentação de *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116, *B. subtilis* R14 e *Bacillus* sp. MEN2

50

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Exemplos de biocontrole de doenças exercido por bactérias endofíticas em diversas culturas	7
Tabela 2.2 - Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças de plantas	10
Tabela 4.1 - Concentrações de biomassa e de glicose no líquido fermentado, após 72 horas de cultivo de <i>B. subtilis</i> R14, <i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7, <i>B. megaterium</i> C116 e <i>Bacillus</i> sp. MEN2	35
Tabela 4.2 - Efeito dos tratamentos de sementes de melão com fermentados de <i>Bacillus subtilis</i> R14, <i>B. megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> RAB7, <i>B. megaterium</i> C116 e <i>Bacillus</i> sp. MEN2, para controle da mancha-aquosa causada por <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , em condições de casa de vegetação	39

RESUMO

A mancha-aquosa, causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, é hoje um problema para a cultura do melão nas áreas produtoras do Nordeste, principalmente nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. A doença, sobretudo durante o período chuvoso, chega a dizimar boa parte da produção em algumas lavouras. Microrganismos têm sido usados no controle de doenças de plantas e o gênero *Bacillus* é citado como um dos mais utilizados, devido, em grande parte, à sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, entre as quais lipopeptídeos. O objetivo deste trabalho foi investigar o controle da mancha aquosa do melão por espécies de *Bacillus*. Foram realizados testes in vivo, aplicando-se caldos fermentados de *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *Bacillus* sp. MEN2, com e sem de células, em sementes de melão anteriormente inoculadas com *A. avenae* subsp. *citrulli*. As fermentações foram realizadas em mesa agitadora e o plantio das sementes em bandeja. Testes de antagonismo in vitro foram também realizados pelo método de difusão em ágar. A avaliação dos testes in vivo foi realizada através das seguintes variáveis: incidência (INC = porcentagem de plantas com sintomas) e período de incubação (PI = número de dias transcorridos do plantio até o aparecimento dos sintomas). A severidade foi avaliada, de acordo com escala de notas, diariamente, durante cinco dias, calculando-se o índice de doença (IDO) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *Bacillus* sp. MEN2 apresentaram atividade in vitro contra *A. avenae* subsp. *citrulli* e controlaram a doença in vivo, sem diferença significativa entre as quatro linhagens de *Bacillus*. Os tratamentos, com e sem células, também não apresentaram diferença significativa, indicando que a inibição do crescimento do fitopatógeno ocorreu devido à presença de compostos bioativos produzidos durante as fermentações. Estes compostos foram parcialmente caracterizados como lipopeptídeos, através de testes de hemólise e de atividade surfactante.

ABSTRACT

The bacterial fruit blotch, caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, is a problem that affects the culture of melon in the Northeast Region of Brazil. Microorganisms have been used for plant disease control and the genus *Bacillus* is cited as one of the most used, due mainly to its capacity of producing antimicrobial substances, including lipopeptides. The aim of this work was to investigate the control of the bacterial fruit blotch of melon by *Bacillus* species. Experiments *in vivo* were carried out by applying fermented broths of *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 and *Bacillus* sp. MEN2, with cells and without cells, on melon seeds previously inoculated with *A. avenae* subsp. *citrulli*. The fermentations were performed in rotatory shakers and the seeds planted on trays. *In vivo* antagonism tests were also carried out using the agar diffusion method. The evaluation of the *in vivo* experiments were made through the following variables: incidence (INC = percentage of plants with symptoms) and incubation period (IP= days from planting till symptom occurrence). The severity was evaluated according to a descriptive scale, daily, during five days. The disease index (DI) and area under disease curve progress (AUDCP) were calculated. The results were submitted to variance analyses and the averages compared by Tukey test. *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 and *Bacillus* spp MEN2 showed activity *in vitro* against *A. avenae* subsp. *citrulli* and controlled the disease *in vivo*. The treatments with and without cell showed no significant difference, indicating that the growth inhibition of *A. avenae* subsp. *citrulli* occurred due to the presence of bioactive compounds in the broth produced during the fermentations. These compounds were partially characterized through hemolysis and surfactant activity tests.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do melão (*Cucumis melo* L.) é uma atividade agrícola de grande expressão econômica, principalmente no Nordeste Brasileiro, que é responsável por cerca de 84% da produção total do país. A partir de 1980, a produção nacional de melão vem aumentando, particularmente nas áreas irrigadas do nordeste semi-árido (MARIANO, 2000).

A mancha-aquosa do melão é uma doença importante, causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, que tem preocupado produtores do Nordeste do Brasil, principalmente nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte, que são os maiores produtores desta cucurbitácea. A doença tem ocasionado grandes perdas na produção e depreciação no valor comercial do fruto (SALES JÚNIOR & MENEZES, 2001).

Atualmente, o controle da mancha-aquosa do melão é feito preventivamente, uma vez que o controle químico é pouco eficiente depois que a doença se estabelece na lavoura. A principal medida adotada para o controle da doença é o uso, no plantio, de sementes de boa procedência, embaladas em latas hermeticamente fechadas. Outras medidas de controle são o tratamento das sementes com água quente a 52°C durante 10 minutos, ou com ácido láctico por 20 minutos, e evitar cultivos em áreas úmidas ou em períodos de muitas chuvas. Alguns produtores, visando evitar a doença, fazem também rotação de cultura em áreas contaminadas, deixando o solo livre de cucurbitáceas cultivadas (melancia, melão, maxixe, pepino, chuchu, etc.) ou nativas (bucha e melão de São Caetano) durante 2

a 3 anos. Outros resultados do controle da doença têm sido obtidos com uma adubação equilibrada, evitando-se o excesso de nitrogênio em conjunto com pulverizações preventivas à base de cobre, logo que se inicia a formação dos frutos (SANTOS & VIANA, 2000). Estas medidas de controle, apesar de apresentarem bons resultados, só se tornam viáveis se forem realizadas de forma preventiva.

O controle biológico de fitopatógenos surge como alternativa para a redução do uso de insumos químicos, devido a uma maior conscientização sobre a preservação do meio ambiente. Alguns dos problemas associados ao uso de pesticidas incluem, freqüentemente, falhas no controle de patógenos (seleção dos mutantes), contaminação ambiental e danos à saúde humana. Os insumos químicos, por serem aplicados em muitos casos no solo, têm atingido e contaminado águas superficiais e subterrâneas. Esses e outros motivos, como, por exemplo, a pressão da sociedade por produtos livres de agroquímicos, têm exigido dos pesquisadores e da indústria maior empenho em programas de controle biológico. Dentro deste contexto, os microrganismos apresentam propriedades de conferir proteção às plantas, seja endofiticamente ou epifiticamente, contribuindo para a redução das perdas causadas pelas doenças de plantas na agricultura (MELO, 1998).

Dentre os gêneros de bactérias mais utilizados no biocontrole, *Bacillus* spp. têm grande vantagem em relação aos outros, devido à sua capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, a fertilizantes e ao

tempo de estocagem, permitindo, portanto, sua utilização na formulação de produtos mais estáveis e viáveis (KLOEPPER, 1997). O gênero *Bacillus* também apresenta vantagens devido ao seu rápido crescimento em meio líquido e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Estudos anteriores, realizados no Laboratório de Processos Fermentativos do Departamento de Antibióticos, em colaboração com o Departamento de Agronomia / Área de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco (MONTEIRO, 2002; MONTEIRO et al., 2003), demonstraram a atividade antagônica *in vitro* de *Bacillus* spp. contra diversos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causadora da podridão-negra das crucíferas. Dos oito isolados de *Bacillus* estudados, quatro produziram substâncias capazes de inibir o crescimento de *X. campestris* pv. *campestris*: *B. subtilis* R14, isolado de repolho; *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, isolado de rabanete; *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, ambos isolados de couve.

Sendo a mancha-aquosa uma das principais doenças que vem ocorrendo no melão, o estudo do controle dessa enfermidade é de relevância para a Região Nordeste. Um tratamento de sementes com um produto biológico, que seja eficiente na inibição do patógeno, apresenta-se como uma alternativa de controle desejável (MENEZES et al., 2003). Tendo em vista os bons resultados obtidos anteriormente no controle da podridão negra das crucíferas e as vantagens apresentadas pelo gênero *Bacillus*, os objetivos deste trabalho foram :

- Investigar *in vitro* a atividade antagônica de bactérias do gênero *Bacillus*: *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *Bacillus* sp. MEN2, contra a bactéria fitopatogênica *A. avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha-aquosa do melão;
- realizar fermentações para investigar a produção de compostos bioativos contra *A. avenae* subsp. *citrulli* por diferentes linhagens de *Bacillus*;
- investigar o controle da mancha-aquosa do melão *in vivo*, através do tratamento de sementes com os produtos das fermentações;
- caracterizar, parcialmente, os compostos bioativos produzidos pelas linhagens selecionadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle Biológico

O controle biológico pode ser descrito como a influência de um organismo, o antagonista, sobre o outro, o patógeno, causando uma diminuição dos efeitos provocados por este último em determinada planta hospedeira (ALVES, 1986). Em relação ao controle biológico, antagonista pode ser definido como um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais de fitopatógenos (MARIANO et al., 2002).

O controle biológico ainda pode ser definido como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocadas por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem. Embora o foco de controle biológico seja o patógeno, o objetivo deste controle é a supressão da doença (COOK & BAKER, 1983). No entanto, controle biológico é utilizado, principalmente, com o significado de controle de um patógeno por um antagonista. Em controle biológico de doenças de plantas, estes conceitos envolvem a redução da densidade populacional do patógeno, a proteção biológica da superfície de plantas e o controle dentro da planta (ALVES, 1986).

A introdução de antagonistas adaptados ao microhabitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno. O sucesso do biocontrole, no entanto, dependerá da natureza das propriedades

antagonistas e mecanismos de ação do antagonista. Muitos fungos e bactérias inibem fitopatógenos através da competição por nutrientes, do parasitismo direto e da produção de metabólitos secundários, que podem ser enzimas líticas ou antibióticos (MELO, 1998).

Quando o mecanismo é parasitismo, um organismo, o parasita, vive em associação íntima e total dependência de um outro, chamado de hospedeiro. Na antibiose, o produto metabólico de um microrganismo inibe ou suprime o crescimento de espécies patogênicas. No mecanismo por competição, duas espécies competem por nutrientes ou pelo espaço. Na proteção cruzada, uma célula é infectada por um patógeno atenuado, diminuindo a possibilidade de infecção por outro patógeno, através da “imunização” (SHODA, 2000).

As associações simbióticas benéficas entre microrganismos e plantas são eventos de especial relevância na agricultura. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior da planta, principalmente folhas, ramos e caule, sem causar, aparentemente, qualquer dano ao seu hospedeiro. O processo de proteção de plantas promovido pelos endofíticos é complexo, uma vez que estes apresentam capacidade de proteger seus hospedeiros contra insetos-pragas, patógenos e herbívoros domésticos. Além disso, podem conferir maior resistência aos seus hospedeiros contra condições de estresse hídrico, alterar propriedades fisiológicas das plantas, produzir hormônios vegetais e outros compostos (MELO, 1998).

Bactérias endofíticas, utilizadas no biocontrole de plantas, apresentam como principais vantagens possuírem nicho ecológico similar ao do patógeno e estarem protegidas das diversas influências abióticas. O

tratamento de sementes é o método mais comum de aplicação destes antagonistas, sendo chamada de bacterização de sementes (HALLMANN et al., 1997). A Tabela 2.1 apresenta exemplos de biocontrole de doenças de plantas por bactérias endofíticas.

Tabela 2.1- Exemplos de biocontrole de doenças exercido por bactérias endofíticas em diversas culturas (MARIANO, 2001)

Patógeno/Vetor	Hospedeiro	Agente de biocontrole	Mecanismo de ação
<i>Erwinia tracheiphila</i>	Pepino	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Serratia marcescens</i>	IRS ¹ IRS
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici	Tomate	Pseudomonas fluorescens	IRS
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	Tomate	Bacillus pumilis	IRS
Fusarium f. sp <i>vasinfectum</i>	Algodão	<i>Aureobacterium saperdae</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Phyllobacterium rubiacearum</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Burkholderia solanacearum</i>	antibiose antibiose antibiose antibiose antibiose
Globodera pallida	Batata	Rhizobium etli	IRS
<i>P.syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Pepino – campo	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Bacillus pumilis</i> e <i>Serratia</i> <i>Marcescens</i>	IRS
<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	Algodão	<i>Bacillus</i> sp.	antibiose
Sclerotium rolfsii	Feijão	<i>Bacillus</i> sp.	antibiose
<i>Rhizoctonia solani</i>	Batata	<i>Pseudomonas</i> sp.	antibiose

¹ IRS: Indução de Resistência Sistêmica

Ao se usar um microrganismo como agente de biocontrole, em algumas situações, é possível que ocorra o controle biológico clássico por antagonismo direto sobre o fitopatógeno, com envolvimento dos conhecidos mecanismos de antagonismos, produção de substâncias antimicrobianas, parasitismo direto, competição por nutrientes e por nichos ecológicos (ROMEIRO & GARCIA, 2003).

Ainda, segundo Romeiro & Garcia (2003), talvez um dos casos mais conhecido e estudado seja o do controle biológico da galha em coroa, doença causada por *Agrobacterium tumefaciens* pelo antagonista não fitopatogênico *A. radiobacter*. *A. tumefaciens*, tem o solo como habitat e incita tumores em plantas, os quais são conhecidos vulgarmente como galha ou galha-em-coroa. A bactéria, geralmente, não mata a planta, mas provoca uma redução drástica na produção. Até início da década de 70, não havia nenhuma forma efetiva de controle reconhecida, a não ser medidas de caráter preventivo, como utilizar propágulos e sementes livres da bactéria e evitar o plantio em áreas onde a bactéria havia sido detectada. Nessa época, o grupo de trabalho do Dr. Allen Kerr, da Universidade de Adelaide (Austrália), obteve, de solo, isolados de *A. radiobacter* (saprófita) fortemente antagônica *in vitro* a *A. tumefaciens*. A continuidade das pesquisas mostrou que esse antagonismo era também exercido *in vivo*, estabelecendo-se assim o primeiro caso de controle biológico de uma bacteriose de planta em campo em escala comercial.

Fungos, bactérias e actinomicetos têm sido envolvidos no controle de fitopatógenos. Alguns com sucesso comprovado e outros com potencial de

uso (MELO,1998). A Tabela 2.2 apresenta exemplos de biopesticidas controladores de doenças de plantas.

O controle biológico, portanto, envolve todos os métodos que têm como objetivo limitar o desenvolvimento de pragas, doenças e plantas invasoras através da utilização de agentes biológicos. O controle de fitopatógeno pode ser alcançado através de práticas de manejo, para favorecer antagonistas nativos, e, também, através da introdução de microrganismos selecionados. Neste último caso, estratégias de isolamento de um eficiente agente de biocontrole devem ser adotadas (MELO, 1998).

Tabela 2.2 – Alguns biopesticidas disponíveis comercialmente para controle de doenças de plantas (www.oard.ohio-state.edu/aspsbcc/productlis.htm)

Biocontrolador	Produto	Organismos-alvo
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Norbac 84-C; Agtrol; Galtrol; Diegal	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (agente causador da galha-coroa)
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	Rhiz o-Plus	<i>Alternaria</i> sp. e <i>Fusarium</i> spp. , (patógenos em plantas ornamentais)
<i>Bacillus subtilis</i>	Kodiak	<i>Rhizoctonia</i> spp. <i>Pythum</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. (agentes causadores de podridões radiculares)
<i>Pseudomonas syringae</i>	Bio-save 10LP, 110	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Geotrichum candidum</i> (patógenos de feijão)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	Blight Ban A506	<i>Erwinia amylovora</i> (patógeno de maçã, morango e tomate)
<i>Bacillus subtilis</i> MBI600	Subtilex	<i>Rhizoctonia</i> spp., (patógeno de feijão)
<i>Bacillus subtilis</i> MBI600	Hi Stick N/T	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp. (patógenos de feijão)
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Mycostop	<i>Alternaria</i> sp. e <i>Fusarium</i> spp. (patógenos de plantas ornamentais)

2.2 Mancha-Aquosa do Melão

2.2.1 Características gerais da doença

A mancha-aquosa do melão, importante doença causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, tem sido observada no Rio Grande do Norte e Ceará, sempre com altos índices de infecção (NASCIMENTO et al., 2002). Atualmente, essa doença ocorre nas zonas produtoras do Rio Grande do Norte de forma epidêmica, com perdas na produção de até 100% (SALES JÚNIOR & MENEZES, 2001).

A doença foi detectada nos Estados Unidos, primeiramente, na Flórida, em 1989, e, subsequente, na Carolina do Sul, Carolina do Norte, Maryland e Delaware. Desde então, a mancha da fruta tem sido detectada cada ano, variando em intensidade, em áreas de produção de melão em todos os Estados Unidos (LEAHY, 2002). Neste país, a doença foi responsável por uma expressiva perda em melancia no período de 1989 a 1994. A ocorrência da mancha-aquosa tem sido relatada também em várias regiões produtoras de melancia na Índia, onde é considerada uma doença emergente, pois a incidência tem aumentado nos últimos 20 anos (LATIN et al., 1995).

Uma vez que *A. avenae* subsp. *citruli* é transmitida por sementes de plantas da família Curcubitacea, acredita-se que a doença foi introduzida no Brasil através da importação de sementes de melão infectadas, tendo sido

observada pela primeira vez em campos comerciais de meloeiro, em 1997, no Estado do Rio Grande do Norte (ASSIS et al., 1999). Esta fitobacteriose tem causado grandes prejuízos no Nordeste Brasileiro (ARAÚJO et al., 2002). Além do Ceará e Rio Grande do Norte, a doença já foi relatada no Estado de Pernambuco e nas regiões Sudeste e Centro Oeste (ASSIS et al., 1999).

Em relação aos sintomas, *A. avenae* subsp. *citrulli* pode causar lesões nas plântulas, folhas e frutos, sendo mais comum e facilmente visualizadas nos frutos (LATIN, 1996). Plântulas oriundas de sementes infectadas, quando não entram rapidamente em colapso total, podem, posteriormente, apresentar grandes manchas encharcadas nas folhas cotiledonares, murchar ainda verdes e, então, morrer (VIANA et al., 2000).

Essas lesões são importantes como fonte de inóculo para os frutos. Já as lesões no fruto maduro servem como fonte secundária de infecção no campo (LATIN, 1996). Nas folhas verdadeiras, os sintomas, quando presentes, são algumas vezes exteriorizados como lesões inicialmente pequenas, marrons escuras, necróticas, algumas vezes aquosas e angulares, se estendendo até a nervura central da folha (WALCOTT et al., 2000).

As lesões nos frutos aparecem, inicialmente, como pontos aquosos com 1 a 3 mm de diâmetro, aproximadamente. Em seguida, formam-se manchas de coloração marrom, necróticas, com rachaduras no centro. Estas rachaduras servem como porta de entrada para outras bactérias, que promovem o apodrecimento final do fruto, levando a perdas na produção. A necrose ou a simples lesão na casca não reflete o dano que ocorre na polpa,

imediatamente abaixo, tendo em vista que a parte interna já pode estar bastante comprometida, mesmo quando essa lesão, externamente, se mostra com apenas 0,5 cm a 2,0 cm (VIANA et al., 2000). As lesões localizam-se na superfície que não entra em contato com o solo, progredindo rapidamente (7 a 10 dias) para todo o fruto antes da colheita (ISAKEIT, 1999). A Figura 2.1 mostra os sintomas da mancha-aquosa nos frutos.



(A)

(B)



(C)

Figura 2.1– Mancha-aquosa do melão: (A) sintomas iniciais da doença; (B) sintomas avançados da doença; (C) podridão interna do fruto (http://www.biotecnologia.com.br/noticias/ultima_melão.htm)

2.2.2 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

A bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, causadora da mancha-aquosa do melão, é aeróbia e Gram-negativa; possui forma de bastonete e um único flagelo polar (monotríquia); cresce em até 40°C. Em relação à sua bioquímica, é positiva para catalase, oxidase, lipase e urease; negativa para hidrólise da arginina e fraca para a hidrólise da gelatina, variando de acordo com o isolado. Utiliza como fontes de carbono: β -alanina, α -aminopentanoato, citrato, etanol, etanolamina, frutose, glutarato, lactato, L-leucina, levinulato, N-propanol, D-serina, succinato e D-Xilose (WILLEMS et al., 1992). *A. avenae* subsp. *citrulli* requer alta umidade para a colonização de folhas e frutos (O'BRIEN & MARTIN, 1999), a qual, juntamente com temperatura elevada, favorece o progresso da doença (LATIN, 1996).

Sayonara et al. (1999) relatam que frutos de melão, provenientes de plantio comercial de Ipanguaçu - Rio Grande do Norte, foram recebidos na Clínica Fitossanitária do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco para diagnose. Os frutos apresentavam pequenas lesões encharcadas de formato irregular, medindo em média 5 a 7 mm de diâmetro, e aprofundando-se cerca de 1-2 na epiderme. Isolamentos, em meio NYDA (meio ágar nutriente dextrose levedura), resultaram em colônias bacterianas de coloração beje, circulares fluídas com bordos lisos. Foi realizado teste de patogenicidade em condições de laboratório, transferindo-se, com uma alça de platina, células bacterianas do meio de cultura para ferimentos na superfície de melão das espécies, Valenciano Amarelo, Orange, Pele de Sapo, Cantaloupe e Português. Por ocasião do

aparecimento dos sintomas característicos da mancha-aquosa, nas espécies Valenciano Amarelo, Cantaloupe e Orange, foi efetuado o reisolamento do patógeno em meio NYDA. O teste de 95 fontes de carbono em microplacas indicou 88,8% de similaridade com *A. avenae* subsp. *citrulli*. A identificação dos isolados foi confirmada através de outros testes químicos e características morfológicas.

2.3 Utilização de *Bacillus* spp. no Controle de Fitopatógenos

O gênero *Bacillus* compreende um grupo heterogêneo de bactérias quimiorganotróficas. São Eubactérias pertencentes à família Bacillaceae, Gram-positivas e, geralmente, aeróbias facultativas. O gênero contém um grande número de espécies de importância industrial, como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. pumilis* e *B. brevis*. *Bacillus* spp. podem secretar metabólitos comercialmente importantes como enzimas e antibióticos, muitos dos quais com atividades antifúngicas (MELO, 1998).

Os *Bacillus* apresentam muitas vantagens com relação à utilização em formulações para aplicação no tratamento de doenças de plantas, como, por exemplo, a capacidade de formar esporos, os quais são tolerantes ao calor e ao frio, bem como a condições extremas de pH, a pesticidas, a fertilizantes e ao tempo de estocagem (BACKMAN et al., 1997). *B. subtilis*

pode ser aplicado tanto no tratamento de sementes e de propágulos vegetativos como pode ser introduzido no solo para controlar doenças de plantas (COOK & BAKER, 1983).

Tratamento de sementes de aveia com uma suspensão de *B. subtilis* A13 proporcionou um aumento de 40% na produção de grãos (MELO,1998).

Uma linhagem de *B. subtilis* (OG), isolada do rizoplane de plantas saudáveis de feijoeiro, reduziu a podridão radicular do feijoeiro, causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, e promoveu o crescimento de plantas e a produção de grãos (MELO et al.,1995).

Leifert et al. (1994) estudaram duas espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* CL27 e *B. pumilis* CL45, e relataram que a atividade exercida *in vivo* contra *Botrytis cinerea*, por *B. subtilis* CL27, era devida à produção de antibióticos peptídicos, pois mutantes dessa espécie, incapazes de produzir o antibiótico, deixavam de apresentar atividade contra esse patógeno.

Luna et al. (2002) testaram isolados de *Bacillus* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LFR-3, tendo como objetivo a produção de um agente biocontrolador para a podridão negra das crucíferas. *B. subtilis* R14, *B. pumilis* C116, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. cereus* demonstraram possuir atividade antibiótica *in vitro*. O antagonismo de oito isolados de *Bacillus* foi investigado por Monteiro et al. (2003), contra nove linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*. O mecanismo de antibiose foi positivo para quatro isolados de *Bacillus* contra todas as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* testadas.

Muitos outros estudos comprovam o controle de patógenos tanto habitantes de solos como de parte aérea de plantas através de espécies de

Bacillus. Entre estes, *B. subtilis* é a espécie mais estudada e sobre a qual há o maior número de relatos (MELO, 1998).

2.3.1 Produção de lipopeptídeos por *Bacillus* spp.

Espécies de *Bacillus* produzem um grande número de peptídios, entre os quais lipopeptídeos, que apresentam grande interesse industrial devido ao amplo espectro de atividades (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

B. subtilis produz os lipopeptídeos surfactina e iturina. A primeira publicação sobre a surfactina, em 1968, aponta este lipopeptídeo como possuidor de um largo espectro antibacteriano (LANG, 2002). A Figura 2.2 mostra a estrutura química da surfactina.

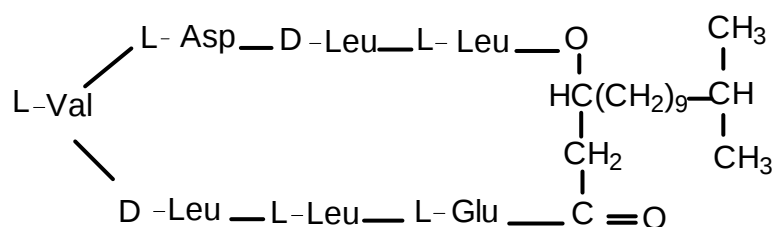


Figura 2.2 Estrutura química do lipopeptídeo surfactina, produzido por *Bacillus subtilis* (DESAI & BANAT, 1997)

A surfactina além de mostrar uma excepcional atividade biossurfactante (BANAT, 2000), inibe a formação de coágulo, lisando eritrócitos e vários esferoplastos e protoplastos bacterianos. Por este motivo,

a sua produção poder ser evidenciada pela atividade hemolítica dos microrganismos (LIN, 1996). Morán et al. (2002) desenvolveram um método quantitativo para a medida de surfactina em sobrenadantes da cultura de *B. subtilis* 09. O método foi baseado na capacidade da surfactina em causar hemólise em suspensão de sangue. Após incubação das misturas das suspensões com os sobrenadantes a 30 ou 37°C por 01 hora, a absorbância da hemoglobina foi lida a 405nm. Esse método mostrou-se simples e de baixo custo para medidas de biossurfactantes em culturas líquidas.

Monteiro (2002), investigando a produção de substâncias bioativas por *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, observou formação de halos de hemólise produzidos por *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210 , sugerindo, desta forma, a produção de lipopeptídeos por estes isolados.

2.3.2 Aplicações de lipopeptídeos

A surfactina é um dos lipopeptídeos mais conhecidos e tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m em concentração tão baixa quanto 0,03% (LIN, 1996). Os surfactantes, como a surfactina e outros lipopeptídeos, são moléculas anfipáticas, constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre faces de diferentes polaridades. Estas propriedades fazem os surfactantes serem

adequados para uma ampla gama de aplicações industriais NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Kim et al.(1997), estudando sobre a produção de biossurfactante por *B. subtilis* C9, obteve lipopeptídeo capaz de emulsificar óleo vegetal e petróleo bruto.

Nitschke & Pastore (2002) mostraram que a iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, afeta a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras. Monteiro (2002) mostrou que *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *B. cereus* C210, produzem compostos surfactantes. A produção destes compostos foi verificada a partir da formação de halos de hemólise em meio ágar sangue, tendo estes mesmos microrganismos apresentado uma relação com a atividade antimicrobiana contra *X. campestris* pv. *campestris*., bactéria fitopatogena, causadora da podridão negra das crucíferas.

Entre as inúmeras aplicações dos biossurfactantes, estes podem ser usados na agricultura em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos dessas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessário agente emulsificante para dispersá-los em soluções aquosas. Surfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas imiscíveis (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Nos últimos anos, biossurfactantes têm obtido considerável interesse devido não só à sua biodegradabilidade, mas também à sua baixa toxicidade (BANAT et al., 2000), que os diferencia dos surfactantes químicos e permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos NITSCHKE & PASTORE, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados quatro linhagens de *Bacillus* como antagonistas: *B. subtilis* R14 (isolado epifítico de repolho), *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 (isolado epifítico de rabanete), *B. megaterium* C116 (isolado epifítico de couve) e *Bacillus* ssp. MEN2 (isolado endofítico de melão), e o fitopatógeno isolado do melão, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Todos estes microrganismos foram fornecidos pelo Laboratório de Fitobacteriologia da Área de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meios para manutenção e reativação das linhagens

- **Ágar nutriente (AN)**

O meio AN foi utilizado para manutenção dos *Bacillus*. Sua composição é (em g/L): extrato de carne (3), peptona de carne (10), NaCl (5) e ágar (15); pH 7.

- **Caldo nutriente (CN)**

O meio CN foi utilizado para realizar a reativação de *Bacillus*. Esse meio apresenta a seguinte composição (em g/L): peptona (3), extrato de carne (5) e NaCl (5); pH 7,2 – 7,4.

3.2.2 Meios para reativação e manutenção do fitopatógeno

- **Meio ágar dextrose levedura nutriente (NYDA)**

O meio NYDA foi utilizado para a conservação da *A. avenae* subsp. *citrulli* e para a realização dos testes de atividade antimicrobiana. Sua composição é (em g/L): ágar nutriente (23), glicose (10) e extrato de levedura(5); pH 7,0.

- **Meio dextrose levedura nutriente (NYD)**

O meio dextrose levedura nutriente sem ágar (NYD), foi utilizado para a reativação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

3.2.3 Meio de fermentação

Para realizar as fermentações com *Bacillus*, foi utilizado um meio para produção de surfactina, proposto por Kim et al. (1997), com algumas

modificações (MONTEIRO, 2002). Sua composição (em g/L) é: glicose (40), K_2HPO_4 (10), $(NH_4)_2SO_4$ (16,92), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (1,7), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,04) e extrato de levedura (0,5); pH 8,0

3.2.4 Meio para determinação da atividade hemolítica

Testes de atividade hemolítica de *Bacillus* foram realizados, como um indicativo da produção de biossurfactantes. Para a realização desses testes, foi utilizado o meio ágar sangue, cuja composição (em g/L) é: extrato de carne (10,0), peptona (10), NaCl (5), ágar (15) e sangue de carneiro (50); pH 7,0.

3.3 Métodos Analíticos

3.3.1 Atividade hemolítica

Para verificar a atividade hemolítica de compostos produzidos por *Bacillus* spp., foi utilizado o método de difusão em ágar. Os microrganismos foram aplicados, com palitos estéreis, sobre a superfície do meio ágar sangue, em placas de Petri, as quais foram incubadas a 37°C. Após 72 horas, foram realizadas as leituras dos halos de hemólise.

3.3.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o método de difusão em ágar. A suspensão do microrganismo teste, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, foi preparada com solução salina 0,9% p/v, de forma que a turbidez fosse igual a do tubo nº1 da escala de McFarland, equivalente a 3×10^8 UFC/mL. Colocou-se 1 mL desta suspensão em cada placa de Petri de 9 cm de diâmetro e 9 mL do meio NYDA. Foram utilizados discos de papel, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 20 µL das amostras retiradas após 72 horas de fermentação.

3.3.3 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa presente no meio fermentado pelas 4 espécies de *Bacillus* foi determinada por peso seco. As amostras foram retiradas após 72 horas de fermentação, tendo sido filtrados 18 mL de cada fermentado em membrana de 0,22 µm e pesadas após 24 horas a 80°C.

3.3.4 Concentração de glicose

A concentração de glicose, presente no meio fermentado por 72 horas foi determinada pelo método do ácido dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

3.3.5 Produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes foi medida indiretamente através da tensão superficial das amostras livres de células, utilizando-se o tensiômetro de Du Nouy. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 5 minutos para utilização do sobrenadante.

3.3.6 Separação parcial do composto bioativo

A separação parcial dos compostos bioativos foi realizada pelo método de precipitação ácida proposto por Cooper et al (1981). Após 72 horas de cultivo, foram filtrados 20 mL do meio fermentado, aos quais foi adicionado HCl até a medida de pH 2,0. As amostras foram colocadas em geladeira por 24 horas para facilitar a precipitação. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 5 minutos, onde o sobrenadante foi desprezado e o precipitado solubilizado em água destilada a pH 11. Foram comparadas as medidas da tensão superficial da água pura e da água com adição do precipitado.

3.4 Cultivos em Frascos Agitados

Culturas de *Bacillus*, mantidas em meio AN, foram reativadas em meio CN. Após 24 horas a 37°C, foram preparadas suspensões (25 mL) de cada microrganismo, de acordo com o tubo nº5 da escala de McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL e inoculadas em frascos Fernbach,

contendo 500 mL do meio de fermentação. Os frascos foram acondicionados em mesa incubadora rotativa, a 30°C e 150 rpm, durante 72 horas. As condições dos cultivos foram conforme aquelas utilizadas por Kim et al. (1997), para a produção de surfactina por *B. subtilis*.

3.5 Avaliação do Controle do Fitopatógeno *in vivo*

3.5.1. Inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* foi inoculada em sementes de melão do tipo amarelo, sadias, previamente selecionadas, através do método de infiltração a vácuo (Figura 3.1). A suspensão do inóculo foi preparada com água destilada esterilizada e a concentração ajustada para $A_{580}=0,25$ medida em fotocolorímetro, que corresponde aproximadamente a $3,4 \times 10^7$ UFC/mL.

Um béquer contendo as sementes imersas na suspensão, foi colocado em um dessecador conectado a uma bomba de vácuo, por 2 períodos de 2 minutos cada, para a infiltração do fitopatógeno. Após este procedimento a suspensão foi desprezada e as sementes colocadas para secar durante 7 dias em temperatura ambiente.

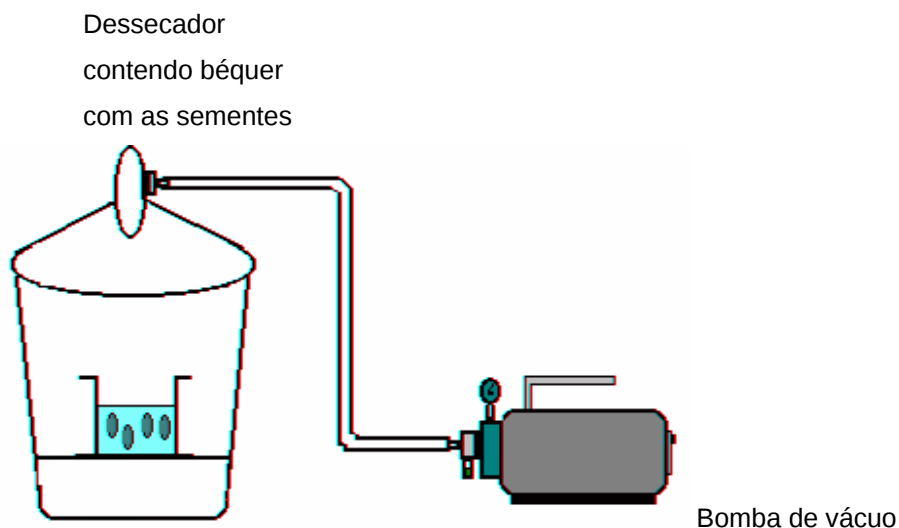


Figura 3.1 Esquema da inoculação do fitopatógeno nas sementes através do método de infiltração a vácuo

3.5.2. Bacterização das sementes

As sementes de melão foram infectadas com *A. avenae* subsp. *citrulli*, por imersão no líquido fermentado, contendo ou não células de *Bacillus*. Foi adicionada ao líquido fermentado uma gota do surfactante químico Tween 80 a 0,05 %, durante trinta minutos. Após este procedimento, as suspensões foram descartadas e as sementes colocadas sobre papel toalha para secar por 24 horas à temperatura ambiente, estando, então, prontas para o plantio.

3.5.3. Semeio e emergência das plântulas

Foram plantadas 576 sementes de melão, previamente inoculadas com *A. avenae* subsp. *citrulli*, sendo 512 sementes bacterizadas com caldo

fermentado, com e sem células do antagonista, e 64 sementes para testemunha, tratadas apenas com água destilada e esterilizada.

As sementes foram plantadas em bandejas contendo substrato comercial organo-vegetal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com os tratamentos (R14 com células; R14 sem células; RAB7 com células; RAB7 sem células; MEN2 com células; MEN2 sem células, C116 com células; C116 sem células e testemunha). Cada tratamento teve 4 repetições com 16 sementes. As bandejas foram colocadas em casa de vegetação.

Após o início da emergência das plântulas, as bandejas foram colocadas em câmara úmida, obtida pela cobertura das mesmas com plástico transparente, por 48 horas, para facilitar a expressão dos sintomas. A Figura 3.2 apresenta o esquema utilizado para o semeio e emergência das plântulas.

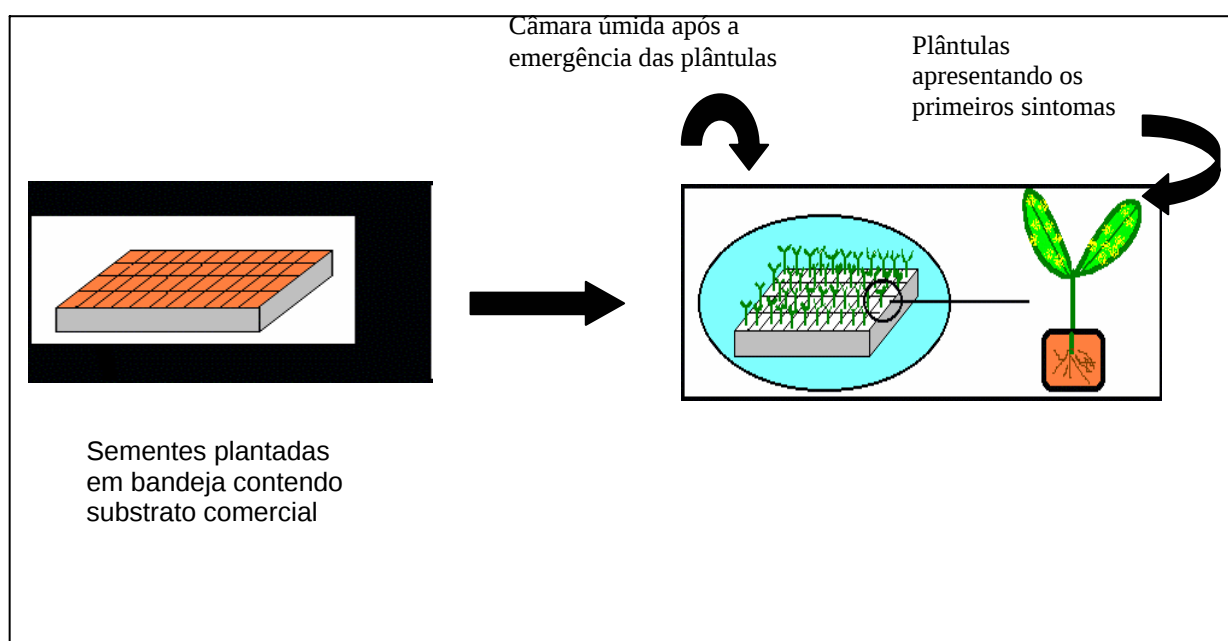


Figura 3.2 Semeio e emergência das plântulas

3.5.4 Avaliação das plantas

Após quatro dias, contados a partir do plantio, foram iniciadas as avaliações observando-se as variáveis: período de incubação (PI), que é o número de dias transcorridos do plantio até o aparecimento dos sintomas; incidência (INC), que é a porcentagem ou proporção (D) de plantas doentes em uma amostra ou população; e severidade, que é a porcentagem da área coberta por sintomas da doença. A avaliação da severidade dos sintomas foi realizada, diariamente, durante cinco dias, com base na escala de notas apresentada na Figura 3.3 (MARIANO, 2000). Com os dados diários de severidade foi calculada a AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença) pela expressão: $AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \cdot d_{ti} / n$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e d_{ti} , o intervalo entre as avaliações (SHANER & FINNEY, 1977). Com a severidade final, calculou-se o índice de doença (IDO) pela fórmula de McKinney (1923).

3.5.5. Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados com delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P = 0,01$), através do software SANEST[®].

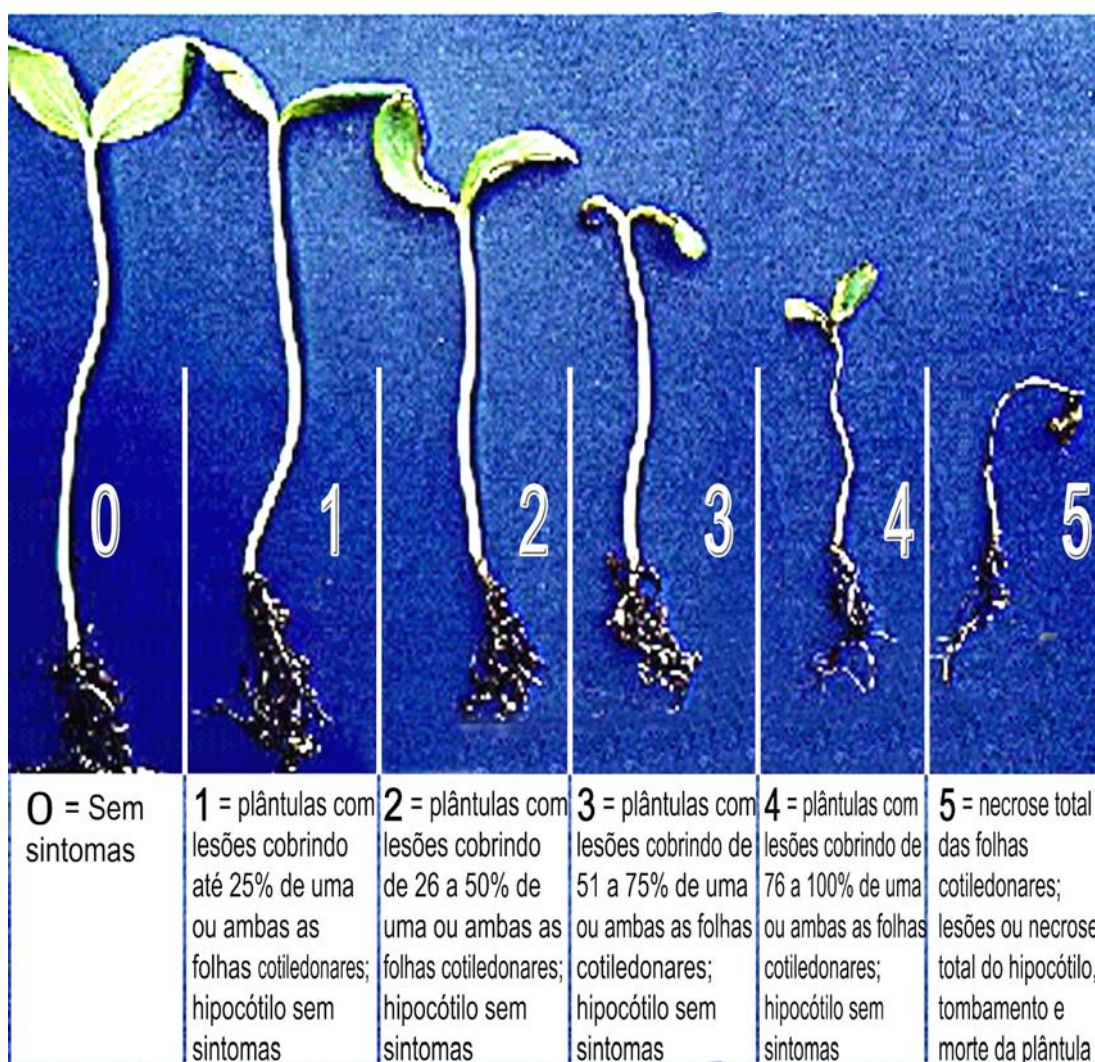


Figura 3.3 Escala de notas, utilizada na avaliação da severidade (MEDEIROS et al., 2002)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

4.1.1 Avaliação através de cultivo em meio sólido

Inicialmente, foram realizados experimentos em meio sólido, para verificar a ocorrência de antagonismo entre *Bacillus* spp. e *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. megaterium* C116 foram selecionados para este estudo por terem apresentado atividade antimicrobiana contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, bactéria causadora da podridão-negra das crucíferas (MONTEIRO et al., 2003). O *Bacillus* sp. MEN2 foi também selecionado por ser um isolado endofítico do melão, uma vez que bactérias endofíticas, utilizadas no biocontrole de plantas, apresentam como principais vantagens possuírem nicho ecológico similar ao do patógeno e estarem protegidas de diversas influências abióticas, conforme discutido no item 2.1

Todas as linhagens de *Bacillus* apresentaram atividade contra a *A. avenae* subsp. *citrulli*. Os experimentos foram avaliados de forma qualitativa e o resultado é discutido adiante, no item 4.3.2.

4.1.2 Avaliação através de cultivo em meio líquido

Em estudo anterior (MONTEIRO, 2002; MONTEIRO et al. 2003), verificou-se a produção de compostos ativos contra *X. campestris* pv. *campestris* durante cultivos submersos de *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. megaterium* C116. Para confirmar a produção, em meio líquido, dos compostos ativos contra *A. avenae* subsp. *citrulli*, já observada em meio sólido, foram realizados ensaios de fermentação com as linhagens de *Bacillus* epifíticas e com o endofítico, *Bacillus* sp. MEN2.

A atividade antimicrobiana foi investigada em amostras livres de células. A Figura 4.1 apresenta os halos de inibição do crescimento da *A. avenae* subsp. *citrulli*, formados por compostos presentes no meio de fermentação, após 72 horas de cultivo. Todos as linhagens de *Bacillus* produziram compostos capazes de inibir o crescimento do fitopatógeno.

Nos testes de atividade antimicrobiana contra *X. campestris* pv. *campestris*, descritos por Monteiro et al. (2003), dentre 8 isolados testados, *B. subtilis* R14 e *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 foram os mais eficientes no antagonismo ao patógeno da podridão negra das crucíferas, sem diferirem entre si, mas diferindo (em relação a algumas linhagens de *X. campestris* pv. *campestris*) de *B. megaterium* C116. Em relação ao antagonismo contra *A. avenae* subsp. *citrulli*, causadora da mancha-aquosa do melão, *B. subtilis* R14 e *Bacillus* sp. MEN2 apresentaram maiores halos

de inibição que *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 e *B. megaterium* C116, conforme visualizado na figura 4.1.

As concentrações de biomassa e de glicose das fermentações, após 72 horas de cultivo, também foram medidas, e a Tabela 4.1 apresenta os valores obtidos para cada linhagem.

Como se pode observar a glicose foi quase totalmente consumida com 72 horas. Monteiro et al. (2003), utilizando o mesmo meio de cultura e os *Bacillus* R14, C116 e RAB-7, observaram completa exaustão da glicose com 72 horas de cultivo.

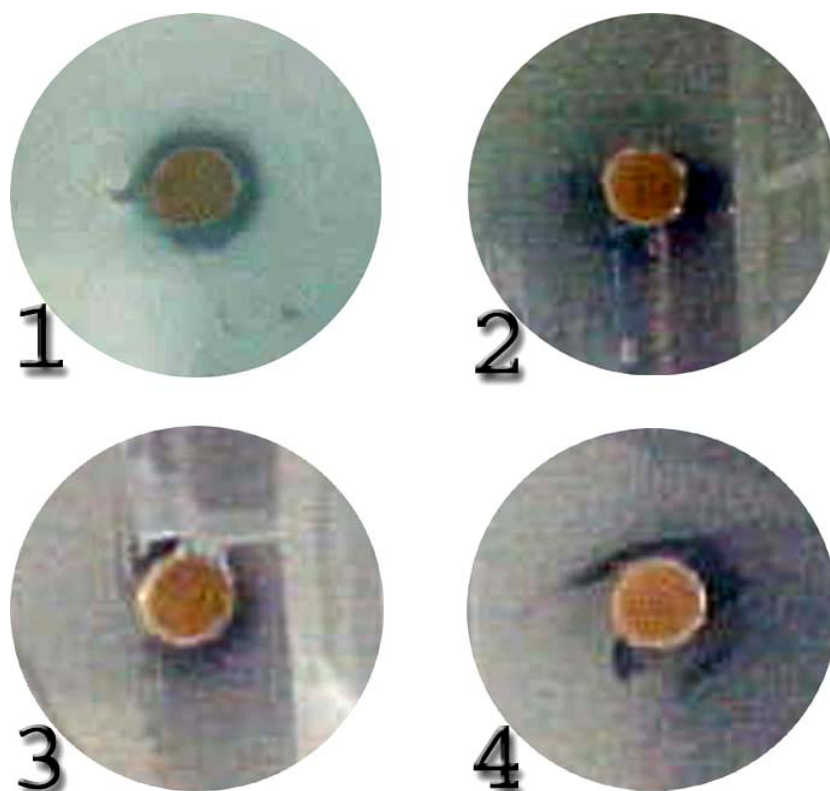


Figura 4.1 Halos de inibição do crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, formados pelo líquido fermentado, após 72 horas de cultivo de (1) *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, (2) *B. subtilis* R14, (3) *B. megaterium* C116 e (4) *Bacillus* sp. MEN2

Tabela 4.1 Concentrações de biomassa e de glicose no líquido fermentado, após 72 horas de cultivo de *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *Bacillus* sp. MEN2

Microrganismo	Biomassa (g/L)	Glicose residual (g/L)
MEN2	2,47	0,57
R14	4,28	0,54
C116	5,05	0,47
RAB7	3,58	0,35

4.2 Controle Biológico da Mancha-Aquosa do Melão *in vivo*

Uma vez confirmada a produção de compostos ativos contra *A. avenae* subsp. *citrulli*, através dos testes *in vitro*, experimentos foram realizados em casa de vegetação para investigar o controle da mancha-aquosa do melão, através do método de “bacterização” de sementes, que, segundo Hallmann et al. (1997), é o método mais comum de aplicação de antagonistas. A tratamento com o líquido fermentado, em sementes previamente infectadas pelo fitopatógeno *A. avenae* subsp. *citrulli*, permitiu avaliar a eficiência *in vivo* das quatro linhagens de *Bacillus* no controle da mancha-aquosa.

O experimento incluiu quatro tratamentos com líquido fermentado contendo células, quatro tratamentos com líquido sem células, e o tratamento testemunha, número total de nove tratamentos, com quatro repetições.

No entanto, os tratamentos com células e sem células não diferiram entre si, e, portanto, na análise estatística, estes tratamentos foram considerados como repetições do mesmo isolado. Este resultado mostra, portanto, a ação de compostos bioativos, produzidos nas fermentações, no controle da mancha-aquosa em plântulas.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de controle da doença. *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. subtilis* R14, *B. megaterium* C116 e *Bacillus* spp. MEN2 diferiram significativamente ($P=0,01$) da testemunha, reduzindo a doença com relação às variáveis: incidência, período de

incubação, índice da doença e área abaixo da curva de progresso da doença. Isto indica um eficiente controle da mancha-aquosa. Obteve-se uma redução da incidência (RINC) e do índice de doença (RIDO) com valores de até 89,1% e 92,7, respectivamente, utilizando-se o *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7. Por outro lado, o período de incubação da mancha-aquosa foi aumentado em até 20,5%, significando que a doença demorou mais a ocorrer. Isto é importante, pois vai interferir no ciclo da doença, podendo reduzir a disseminação entre folhas e infecção dos frutos.

Asaka & Shoda (1996) também constataram que o líquido fermentado, produzido por *B. subtilis* RB-14, com ou sem células, diminuiu a percentagem de plantas infectadas por *Rhizoctonia solani*, causador do tombamento de plântulas de tomateiro. De forma semelhante, Menezes et al. (2003) também verificaram que não houve diferença significativa quando foi aplicado o líquido fermentado, com ou sem células, de *Bacillus* sp. MEN2 e de *Bacillus* sp. RAB9 para inibição de *A. avenae* subsp. *citrulli* *in vitro*, e para controle biológico da mancha-aquosa, *in vivo*.

Tabela 4.2 – Efeito do tratamento de sementes de melão com fermentados de *Bacillus subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116 e *Bacillus* sp. MEN2, para controle da mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, em casa de vegetação

Tratamentos	PI ¹ (d)	INC ² (%)	RINC ³ (%)	IDO ⁴ (%)	RIDO ⁵ (%)	AACPD ⁶
RAB7	11,87 ⁷ a	7,03 b	89,1	2,96 b	92,7	0,17 b
R14	11,62 a	19,38 b	70,1	7,88 b	80,6	0,41 b
C116	11,57 a	18,75 b	71,1	7,81 b	80,8	0,64 b
MEN2	11,50 a	16,51 b	74,4	7,36 b	81,9	0,73 b
TEST	9,84 b	64,72 a	-	40,75 a	-	3,36 a
CV (%)		26,64		33,03		13,97

¹ PI = Período de incubação

² INC = Incidência da doença

³ RINC = Redução da incidência da doença

⁴ IDO = Índice de doença, calculado pela fórmula, $IDO = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{freqüência}) \times 100}{(n^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$ (Mckinney 1923)

⁵ RIDO = Redução do índice de doença

⁶ AACPD = Área abaixo da curva de progresso da doença, calculada pela fórmula $AACPD = \frac{\sum (y_i + y_{i+1})/2 \cdot d_{ti}}{n}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados e d_{ti} o intervalo entre as variações (SHANEY & FINNEY, 1977)

⁷ Média de 8 repetições com 16 plantas; médias seguidas por letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Bacillus sp. MEN2, endofítico de placenta de melão, apresentou desempenho semelhante aos demais isolados testados, com relação ao controle biológico da mancha-aquosa do melão, uma vez que não foram observadas diferenças significativas. Vale ressaltar que existem controvérsias sobre a utilização de microrganismos endofíticos para o controle de doenças em plantas. Alguns autores não consideram a especificidade isolado-hospedeiro essencial para a promoção do crescimento do hospedeiro (GLICK, 2000; SHISHIDO & CHANWAY, 1998), enquanto outros enfatizam esta característica como necessária (ENEBAK et al., 1998).

Assim como no caso do controle da podridão-negra das crucíferas (MONTEIRO, 2002), os resultados obtidos neste trabalho indicam que o mecanismo de antibiose tem um papel primordial no controle da mancha-aquosa do melão por *Bacillus*.

As Figuras 4.2–4.9 apresentam o desenvolvimento de plântulas de melão submetidas a cada um dos oito tratamentos, em relação à testemunha, não tratada.



Figura 4.2 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *Bacillus subtilis* R14, contendo células (testemunha do lado esquerdo)



Figura 4.3 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *Bacillus subtilis* R14, sem células (testemunha do lado esquerdo)



Figura 4.4 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7, contendo células (testemunha do lado esquerdo)



Figura 4.5 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7, sem células (testemunha do lado esquerdo)



Figura 4.6 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *B. megaterium* C116, contendo células (testemunha do lado esquerdo)



Figura 4.7 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *B. megaterium* C116, sem células (testemunha do lado esquerdo)

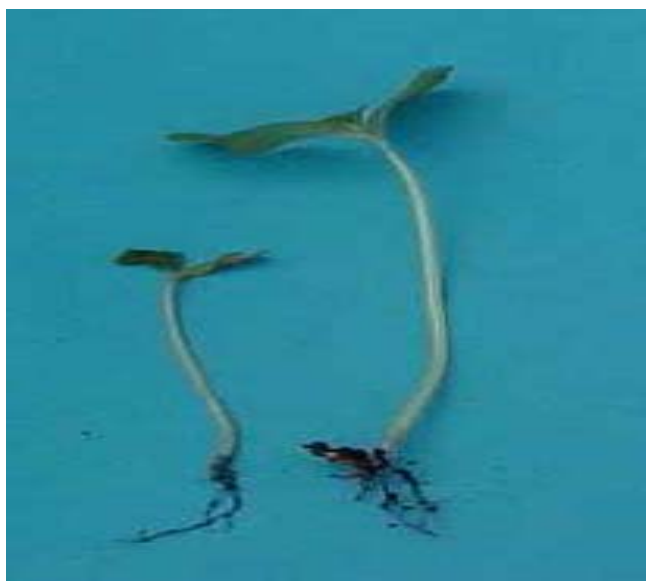


Figura 4.8 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *Bacillus* sp. MEN 2, contendo células (testemunha do lado esquerdo)



Figura 4.9 Plântula oriunda de semente tratada com o líquido fermentado de *Bacillus* sp. MEN 2, sem células (testemunha do lado esquerdo)

4.3 Caracterização dos Compostos Bioativos

Os resultados dos experimentos *in vitro* mostraram que todos *Bacillus* testados, produzem compostos com atividade contra *A. avenae* subsp. *citrulli*. Os resultados *in vivo* demonstraram que o mecanismo de antibiose é o principal responsável pelo controle da doença, uma vez que o líquido sem células foi tão eficiente no controle da mancha-aquosa do melão quanto o líquido com células.

A caracterização parcial dos compostos bioativos responsáveis pelo controle da mancha-aquosa do melão foi baseada no estudo prévio de Monteiro (2002), direcionando-se a investigação para a relação entre o controle da doença e a produção de lipopeptídeos por *Bacillus*.

4.3.1 Atividade hemolítica

A capacidade de destruir eritrócitos em meio ágar sangue tem sido utilizada para ensaios de seleção de microrganismos produtores de surfactantes, sendo o tamanho do halo de hemólise associado à capacidade de produção dessas substâncias (LIN, 1996). Como discutido no item 2.3, lipopeptídeos são moléculas anfipáticas, capazes de lisar eritrócitos.

Os testes de hemólise foram realizados para investigar se *Bacillus* sp. MEN2 formava halo de hemólise, como um indicativo da produção de lipopeptídeo, e confirmar a ação hemolítica de *B. megaterium* pv. *cerealis*

RAB7, *B. subtilis* R14, *B. megaterium* C116. A Figura 4.10 apresenta os resultados da atividade hemolítica dos quatro *Bacillus*. Entre os epifíticos, *B. megaterium* C116 apresentou o maior halo, confirmando os resultados de Monteiro (2002). Entre todos *Bacillus* testados, a linhagem endofítica, *Bacillus* sp. MEN2, produziu o segundo maior halo de hemólise.

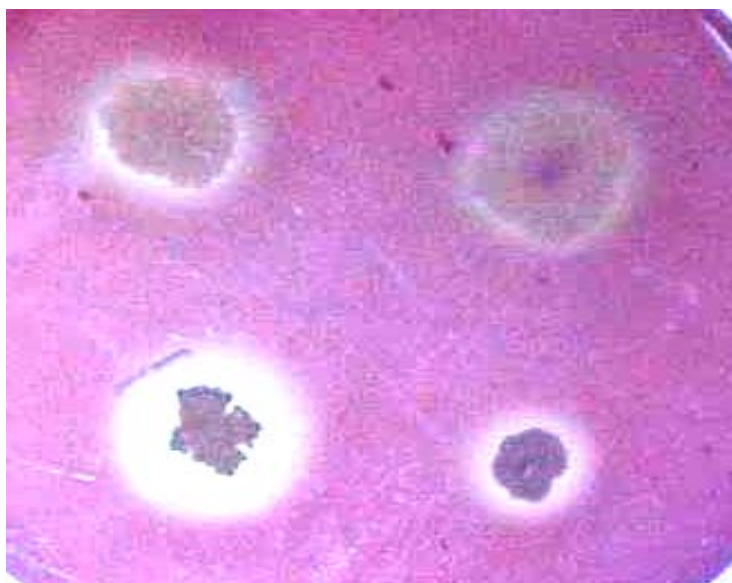


Figura 4.10 Atividade hemolítica de *Bacillus* (no sentido horário, a partir do quadrante esquerdo superior): *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *Bacillus* sp. MEN2 e *B. megaterium* C116

4.3.2 Atividade antimicrobiana dos compostos hemolíticos

Para verificar se os compostos presentes na zona de hemólise apresentavam atividade antimicrobiana, após a formação dos halos de hemólise pelos 4 *Bacillus* testados, estes foram cortados com um instrumento apropriado e colocados, de forma estéril, sobre a superfície de meio ágar dextrose levedura nutriente, em placas de Petri, contendo a suspensão do fitopatógeno. As placas foram incubadas a 30°C por 18 horas. A Figura 4.11 apresenta o resultado da atividade antimicrobiana contra *A. avenae* subsp.*citrulli*. O teste foi positivo para todos *Bacillus*, demonstrando a produção de compostos com ação surfactante e antimicrobiana, com ação antagônica contra o patógeno.

A correlação dos testes de atividade antimicrobiana com os de hemólise sugere que os compostos presentes na zona de hemólise têm um papel no antagonismo apresentado por esses microrganismos.



Figura 4.11 Atividade antimicrobiana de compostos bioativos presentes nas zonas de hemólises, produzidas por (no sentido horário, a partir do quadrante esquerdo superior): *B. subtilis* R14; *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7; *Bacillus* sp. MEN2 e *B. megaterium* C116

4.3.3 Atividade surfactante em meio líquido

Para verificar a produção de compostos com ação surfactante durante cultivos em meio líquido, fermentações foram realizadas com os quatro *Bacillus* e, após 72 horas de cultivo, foram avaliadas as tensões superficiais do líquido fermentado, livre de células, como uma medida indireta da produção de biossurfactantes. Os resultados, no entanto, não foram conclusivos. Segundo Cooper et al. (1981), os biossurfactantes se

concentram, geralmente, na espuma formada durante os cultivos submersos. As amostras retiradas do meio reacional continham pouca espuma, devido à dificuldade de sua remoção. Conseqüentemente, ao medir a tensão do líquido fermentado sem espuma, a tensão superficial não serviu como uma medida conclusiva da produção de biossurfactantes. A Figuras 4.12 apresenta fotos que ilustram o aspecto da espuma formada durante os cultivos.

Assim, para se evidenciar a produção de lipopeptídeos durante as fermentações, foi necessário se realizar uma separação parcial destes compostos, com precipitação ácida. Após precipitação com HCl, as mostras foram centrifugadas e o precipitado solubilizado em água destilada a pH 11. A adição de precipitado de todas as amostras reduziu a tensão superficial da água, que originalmente era 70 mN/m, para valores em torno de 40-50 mN/m (Figura 4.13). Dessa forma, foi possível se verificar a presença de compostos com atividade surfactante, produzidos durante as fermentações de todos os quatro *Bacillus*.



Figura 4.12 - Aspecto do fermentado, após 72 horas do cultivo de (no sentido horário, a partir do quadrante esquerdo superior): *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116, *B. subtilis* R14 e *Bacillus* sp. MEN2

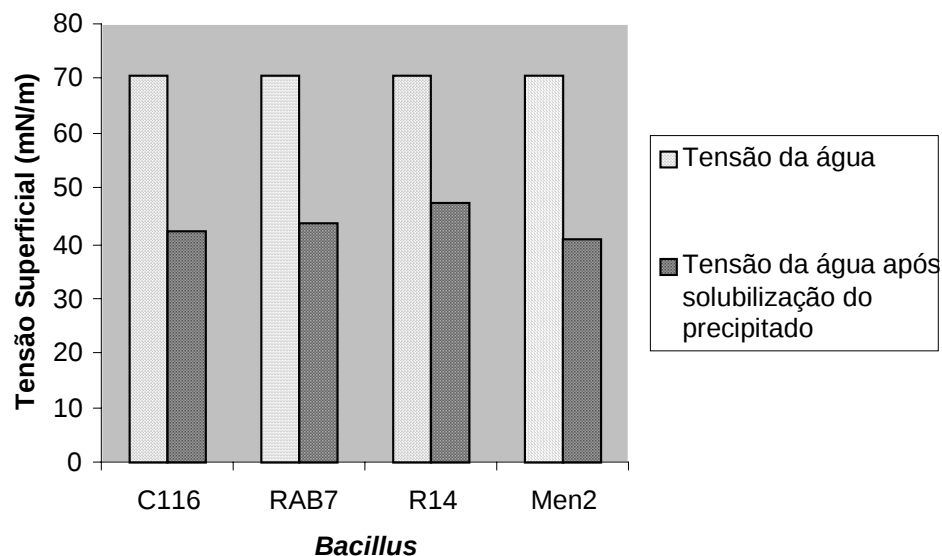


Figura 4.13 Comparação entre a tensão superficial da água pura antes e após solubilização de precipitado ácido, obtido após 72 horas de fermentação de *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. megaterium* C116, *B. subtilis* R14 e *Bacillus* sp. MEN2

Na agricultura, os surfactantes químicos são utilizados para aumentar a penetração de compostos nas plantas (KOSARIC, 1996). Stanghellini & Miller (1997) investigaram os efeitos de surfactantes sintéticos no controle de infecções de fungo, causadas por *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici*, e observaram lise dos fungos devido à presença de metabólitos bacterianos na solução nutritiva. Posteriormente, esses metabólitos foram identificados como biossurfactantes, com o modo de ação semelhante aos surfactantes sintéticos. Subseqüentemente, a bactéria foi identificada como *Pseudomonas aeruginosa* e o biossurfactante como raminolipídeo (STANGHELLINI & MILLER, 1997).

5. CONCLUSÕES

- *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* Rab7, *Bacillus* sp. Men2 e *B. megaterium* C116 apresentam antagonismo contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha-aquosa do melão.
- Não foi observada especificidade do *Bacillus* sp. MEN2, endofítico do melão, no controle da mancha-aquosa em relação aos isolados epifíticos de crucíferas.
- O controle da doença não diferiu nos tratamentos, com ou sem células, indicando que as substâncias bioativas, presentes no líquido fermentado, foram responsáveis pelo antagonismo contra a *A. avenae* subsp. *citrulli*.
- As linhagens de *Bacillus* investigadas são produtores de compostos surfactantes, os quais apresentaram uma relação com a atividade antimicrobiana contra a *A. avenae* subsp. *citrulli*.

6. SUGESTÕES

Sugere-se que, em estudos posteriores, sejam realizados experimentos direcionados para:

- Identificar os compostos bioativos produzidos por *B. subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* Rab7, *Bacillus* sp. Men2 e *B. megaterium* C116, utilizando-se técnicas de cromatografia e espectrometria de massa.
- Determinar condições de fermentações apropriadas para a produção dos compostos identificados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo **Ed. Manoel Ltda.** 1986.

ARAÚJO, D.V.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J. Métodos de Preservação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e Sobrevivência em Sementes de Melão. **Fitopatologia Brasileira**. Fortaleza. v. 27, p. 53, 2002.(Resumo).

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996.

ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; SILVA-HANLIN, D.M.W.; DUARTE, V. Mancha-Aquosa do Melão Causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**. v. 24, n. 2, 1999 (Resumo).

BACKMAN, P.A.; WILSON, M.; MURPHY, J.F. Bacteria for Biological Control of Plant Diseases. In: **RECHCIGL, N.A., RECHCIGL, J.E. Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis Publishers, p. 95-109, 1997.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial Aplications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 53, p. 495-508, 2000.

COOCK, R.J.; BAKER, K.F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Diseases **St. Paul American Phytopathological Society**. p. 639, 1983.

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF; S.J.B. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

DESAI, J. D.; BANAT, I.M. Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews USA**. v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.E.; KLOEPPER, J.W. Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Loblolly and Slash Pine Seedling. **Forest Science**, Bethesda. v. 44, n. 1, p. 42, 1998.

GLICK, B.R. Protecting Plants from the Effects of Ethylene Using ACC Deaminase Containing Plant Growth-Promoting Bacteria. **In: Annals of International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**. Cordoba, v. 1, p. 42, 2000.

HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Application of the Scholander Pressure Bomb to Studies on Endophytic Bacteria of Plants. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 411-416, 1997.

ISAKEIT,T. Bacterial Fruit Blotch in Watermelon. **The Agricultural Extension Service- USA**.1999.

KIM, H.S.; YOON, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H.; HO, M.H. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 84, n. 1, p. 41-46, 1997.

KOSARIC, N. Biosurfactants. **In: Journal of Biotechnology**. v. 6, p. 659-717, 1996.

KLOEPPER, J.W. Current Status and Future Trends in: Biocontrol Research and Development in the U.S. **In: International Symposium on Clean Agriculture**. Sapporo, Japan. OECD-OCDE. p. 49-52, 1997.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants). **In Colloid & Interface Science**. v. 7, p. 12-20, 2002.

LATIN, R.X.; TIKHONOVA I.; RANE; KAREN. Factors Affecting the Survival and Spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Watermelon Transplant Production Facilities. **The American Phytopathological Society**. v. 85, n.11, 1995.

LATIN, R.X. Bacterial Fruit Blotch. **In Compendium of Cucurbit Diseases**. (Eds T.A. Zitter. D.L. Hopkins & C.E. Thomas) p. 34-35 (APS Press: St Paul, Minnesota. USA),1996.

LEAHY, R. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. Disponível em: <http://doacs.state.fl.us/us/~pi/enpp/pathology/fruit-blotch.htm>.2001
Acesso em: 24/08/2002.

LEIFERT, C.; LI, H.; CHIDBUREE, S.; HAMPSON, H.; WORKMAN, S.; SIGEE, D.; EPTON, H.A.S.; HARBOUR, A. Antibiotic Production and Biocontrol Activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilis* CL45. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 78, p. 97-108, 1994.

LIN, S.C. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal Chemical Technology**. v. 66, p. 109-120, 1996.

LUNA, C.L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Production of a Biocontrol Agent for Crucifers Black Rot Disease. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 19, n. 02, p. 133-143, 2002.

MCKINNEY, R.H. Influence of Soil Temperature and Moisture on Infection of Wheat Seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agriculture**. v. 39, p. 479-485, 1923.

MARIANO, R.L.R. Biocontrole de Doenças de Plantas. In: Semana de Fitossanidade, Livro de Palestras e Mini Cursos - **Desafios no Manejo Integrado de Pragas e Doenças**. UFRPE, p. 78-111, 2000.

MARIANO, R.L.R. Potencial de Bactérias Endofíticas para Utilização na Agricultura. **Anais da II Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**. Bento Gonçalves, RS, p. 7-17, 2001.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A. Controle Biológico de Doenças Radiculares. In Michereff, S.J.; MENEZES, M. (Eds.) **Ecologia de Patógenos Radiculares**. p. 3-7, 2002.

MEDEIROS, F.H.V.; MORAES, I.S.F.; MARIANO, R.L.R. Bacterização de Sementes para o Controle da Mancha-Aquosa do Melão. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, p. 64, 2002 (Resumo).

MELO, I.S.; VALARIM, P.J.; RAULL, J.L. Controle Biológico de *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* Isolado de Rizosfera de Feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v 20, p. 360, 1995.

MELO, I.S. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatógenos. In Melo & Azevedo, J.L (Eds.) Controle Biológico. Jaguarariúna: Embrapa Meio Ambiente. v. 1, p.17-67, 1998.

MENEZES, E.P.S.; VIANA, I.O.; SANTOS, E.R.; GOUVEIA, E.R.; MARIANO, R.L.M. Produção de Substância Ativa Contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. In: **Anais do XVI Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis. CD- Rom, 2003.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. v 91, p. 426-428, 1959.

MONTEIRO, L. Produção de Substâncias Bioativas de *Bacillus* spp. contra *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **(Dissertação de Mestrado): Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos**. 63 folhas, 2002.

MONTEIRO, L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Production of Active Compounds against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by *Bacillus* species. In **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis. CD- Rom, 2003.

MORÁN, A.C.; MARTÍNEZ, A.M.; SIÑERIZ, F. Quantification of Surfactin in Culture Supernatants by Hemolytic Activity. **Biotechnology Letters**. v. 24, p. 177– 80, 2002.

NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, E.I.; ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R. Hospedeiros Alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, p. 66, 2002 (Resumo).

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**. v. 25, n. 5, p. 777-776, 2002.

O'BRIEN, R.G.; MARTIN, A.L. Bacterial Blotch of Melons Caused by Strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v.39. p .479-485, 1999.

ROMEIRO, R.S.; GARCIA, F.A.O. Controle Biológico de Enfermidades de Plantas Incitadas por Bactérias. **RAPP**, v. 2, 2003.

SALES JÚNIOR, R.E.; MENEZES, J.B. Mapeamento das Doenças Fúngicas, Bacteriana e Viróticas do Cultivo do Melão no Estado do Rio Grande do Norte. Mossoró: **Relatório Técnico da Escola Superior de Agricultura de Mossoró**. p. 25, 2001.

SANTOS, A.A.; VIANA, F.M.P. Não Deixe a Mancha-aquosa do Melão entrar na sua Lavoura. **Encarte Técnico da Embrapa**. 2000.

SHALET, S.; STREICHMAN S.; MARMUR, A. The Use of Hemolyses Kinetics to Evaluate Erythrocyte-Bound Surfactant. **Journal of Colloids and Surface B: Biointerfaces**. v. 28, p. 1-8, 2002.

SHALET, S.; STREICHMAN S.; MARMUR, S. Monitoring Surfactant-Induced Hemolysis by Surface Tension Measurement. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 255, p. 265- 269, 2002.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The Efect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**. St. Paul, v. 67, n. 8, p. 1051–1056,1977.

SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Spruce Growth Response Specificity after Treatment With Plant Growth-promoting *Pseudomonads*. **Canadian Journal of Botany**. v. 77, p. 22-31, 1998.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 89, n. 6, p. 515, 2000.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, M. R. Biosurfactants - Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. **The American Phytopathological Society - Plant Disease**. v. 81, n. 1, 1997.

VIANA, F.M.P.; SANTOS, A.A.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.C.O.; LOPES, C.A. Surto da Mancha-Aquosa de Melão nos Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte. **Comunicado Técnico nº 50 da Embrapa**. 2000.

WALCOTT, R.R.; LANGSTON, J.R.; SANDERS, J.R.; GITAITIS, R.D. Natural Outbreak of a Bacterial Fruit of Cantaloupe in Georgia Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, 2000. Disponível em: <http://www.planthehealthprogress.org/current/notes/cantageorgia/article.htm> acesso em:20.03.2002.

WILLEMS, A.; GOOR, M.; THIELEMANS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of Several Phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *catleeyae*, and *Acidovorax konjaci*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.42, p.107, 1992.