



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO (PPGBRPH)

RODOLFO SODRÉ TAVARES

Lactobacillus spp. COMO FORMA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITOBACTÉRIAS DO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)

Goiânia

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ [X] Dissertação ☐ [] Tese

2. Nome completo do autor

Rodolfo Sodré Tavares

3. Título do trabalho

**Lactobacillus spp. COMO FORMA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITOBACTÉRIAS DO TOMATEIRO (Solanum lycopersicum L.)**

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser
preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento [x]

SIM ☐ [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira**, Professor do Magistério Superior, em 13/09/2021, às 13:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **RODOLFO SODRÉ TAVARES**, Usuário Externo, em 13/09/2021, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2321899** e o código CRC **78968582**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO (PPGBRPH)

RODOLFO SODRÉ TAVARES

Lactobacillus spp. COMO FORMA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITOBACTÉRIAS DO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação
Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de
Goiás, como exigência para a obtenção do Título
de Mestre, na área de concentração de Biologia da
Relação Parasito-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Goiânia

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Tavares, Rodolfo Sodré

Lactobacillus spp. COMO FORMA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOBACTÉRIAS DO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)
[manuscrito] / Rodolfo Sodré Tavares. - 2021.

x, 66 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2021.
Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Controle biológico. 2. fitobactérias. 3. pesticidas. 4. antibióticos. 5. ecotoxicidade. I. Vieira, José Daniel Gonçalves, orient. II. Título.

CDU 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE RODOLFO SODRÉ TAVARES - Aos vinte e sete dias do mês de agosto do ano de 2021 (27/08/2021), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA** (UFG), **LILIAN CARLA CARNEIRO** (UFG) e **ABADIA DOS REIS NASCIMENTO** (UFG) para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "***Lactobacillus* spp. COMO FORMA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOBACTÉRIAS DO TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**", em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **RODOLFO SODRÉ TAVARES**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. **JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato Aprovado ou Reprovado:

Banca Examinadora	Aprovado / Reprovado
Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira	Aprovado
Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro	Aprovado
Profa. Dra. Abadia dos Reis Nascimento	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato **Habilitado (Habilitado ou não Habilitado)**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

***Lactobacillus* spp. COMO FORMA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOBACTÉRIAS DO TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)**



Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro**, Professor do Magistério Superior, em 27/08/2021, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira**, Professor do Magistério

17/09/2021

SEI/UFG - 2284518 - Ata de Defesa de Dissertação



Superior, em 27/08/2021, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Abadia Dos Reis Nascimento, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2284518** e o código CRC **B5ADBB91**.

Referência: Processo nº 23070.043613/2021-46

SEI nº 2284518

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus nosso senhor, pela oportunidade e força para seguir sempre em frente, por mostrar-me o caminho da ciência e a minha avó, Sindalva França Tavares por seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus nosso senhor pois, a cada dia longo e cansativo, ele me concedeu a oportunidade de ser paciente, para os dias difíceis tive a oportunidade de ser forte, e para os piores dias, tive a oportunidade de ter fé.

Aos meus pais Tavares e Creuza pelo incentivo, a Lourdes e Sindalva pelo apoio e incentivo, a Manuella Tavares, e a minha família por todo o carinho.

Agradeço ao professor e amigo Renan por acreditar e me incentivar a embarcar nesta jornada. Ao amigo Aristides que me ensinou como refinar minhas técnicas e, pelos ensinamentos que levarei para sempre comigo.

Obrigado a minha noiva pela paciência e compreensão, pelos dias em que passei focado no projeto. A minha sogra Suely e o sogro Balduino.

A todos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia pela amizade e ajuda mútua na realização dos experimentos.

A Escola de Agronomia da UFG em especial a professora Abadia pelas amostras concedidas.

Ao Prof. Dr. Walmirton Bezerra D'Alessandro pela amizade e incentivo desde a graduação.

Aos membros da banca examinadora do Exame de Qualificação, Dr.^a Lilian Carla Carneiro e Profa. Dr.^a Mônica Santiago Barbosa, pelas sugestões.

Aos amigos e todas as pessoas envolvidas no projeto em especial a "*chimoltrúfia*" pelo incentivo constante.

Dedico ainda ao meu orientador Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira por ter acreditado no meu potencial, pelo seu incentivo, amizade e pela oportunidade de ser seu orientando. Obrigado por confiar em mim Daniel.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

*Há uma força motriz mais poderosa que
o vapor, a eletricidade e a energia
atômica: A vontade.*
(Albert Einstein)

RESUMO

Os processos atuais para o controle de doenças do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) incluem em sua maioria, a aplicação de pesticidas químicos e a utilização de antibióticos na tentativa de amenizar diversas doenças. Entre as fitobactérias, patovares de *Xanthomonas* spp., *Pectobacterium cavotovorum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata* e *Ralstonia solanacearum* são reportadas em todo o mundo, levando ao aparecimento de doenças como a mancha bacteriana, podridão mole e a contaminação das sementes cursando com grandes perdas econômicas. A aplicação de bactérias do ácido láctico (BAL) como forma de controle biológico surge como uma promissora alternativa as principais medidas de controle adotadas para doenças causadas por fitobactérias tanto pela sua eficácia quanto pela sua viabilidade, como é o exemplo de países como Indonésia, Guatemala e Holanda que incorporaram a utilização do controle biológico obtendo bons resultados na produção. Este estudo utiliza espécies de *Lactobacillus* spp. como forma de controle biológico frente a espécies de fitobactérias do tomate. Foi realizada a coleta de material da Escola de Agronomia (EA) da Universidade Federal de Goiás (UFG) a partir de tomateiros sadios sem sintomas de doenças na tentativa de obter cepas de BAL biologicamente ativas frente a fitobactérias selecionadas. Também foram coletadas amostras de folhas de tomateiros com sintomas de mancha bacteriana na EA da UFG; em seguida também foi realizada a triagem por cepas de BAL a partir de cultura starter obtidas do mercado local. Os resultados deste estudo indicam promissora atividade antimicrobiana de amplo espectro onde, as cepas de *Lactobacillus johnsonii*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. Breve* e *L. sporogenes* demonstraram “*in vitro*” atividade antimicrobiana frente diferentes fitobactérias. Os dados apresentados neste estudo revelam o potencial promissor das cepas de BAL como forma de controle biológico como uma alternativa viável a pesticidas químicos e antibióticos, ajudando a mitigar o impacto na saúde humana, animal e ambiental.

Palavras-chave: controle biológico, fitobactérias, pesticidas, antibióticos, ecotoxicidade

ABSTRACT

Current processes for the control of tomato diseases (*Solanum lycopersicum* L.) mostly include the application of chemical pesticides and the use of antibiotics in an attempt to alleviate various diseases. Among the phyto bacteria, *Xanthomonas* spp. pathovars, *Pectobacterium cavotovorum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas corrugata* and *Ralstonia solanacearum* are reported all over the world, leading to the appearance of diseases such as bacterial spot, soft rot and seed contamination, leading to great economic losses. The application of lactic acid bacteria (LAB) as a form of biological control appears as a promising alternative to the main control measures adopted for diseases caused by phyto bacteria, both for its effectiveness and for its viability, as is the example of countries such as Indonesia, Guatemala and Holland, who incorporated the use of biological control with good results in production. This study uses *Lactobacillus* spp. species as a form of biological control against tomato phyto bacteria species. The collection of material from the School of Agronomy (EA) of the Federal University of Goiás (UFG) was carried out from healthy tomato plants without disease symptoms in an attempt to obtain biologically active BAL strains against selected phyto bacteria. Samples of tomato leaves with symptoms of bacterial spot were also collected in the EA of the UFG; then, the selection of BAL strains from starter culture obtained from the local market was also carried out. The results of this study indicate promising broad-spectrum antimicrobial activity where strains of *Lactobacillus johnsonii*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. Breve* and *L. sporogenes* demonstrated “*in vitro*” antimicrobial activity against different phyto bacteria. The data presented in this study reveal the promising potential of BAL strains as a form of biological control as a viable alternative to chemical pesticides and antibiotics, helping to mitigate the impact on human, animal and environmental health.

Keywords: biological control, phyto bacteria, pesticides, antibiotics, ecotoxicity

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DO TOMATE COMO ALTERNATIVA A DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E ANTIBIÓTICOS

Tabela 1: Classificação toxicológica aguda por via oral, cutânea e inalatória (DL₅₀).....29

Tabela 2: Principais grupos de agrotóxicos utilizados em plantações de tomate no Brasil.....30

Tabela 3: Principais agentes de controle biológico utilizados em plantações de tomate no Brasil e no mundo.....32

Tabela 4: Principais produtos químicos e biológicos utilizados no controle de doenças do tomate.....33

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2: ANTAGONISMO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS* FRENTE A FITOBACTÉRIAS

Tabela 1: Atividade antagônica de diferentes espécies de *Lactobacillus* crescidas em caldo e agar MRS frente a diferentes isolados de bactérias fitopatogênicas.....54

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DO TOMATE COMO ALTERNATIVA A DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E ANTIBIÓTICOS

Figura 1: O continente asiático representado pela China e Índia representa cerca de 80% da produção mundial de tomate. 1 megagrama = 1 tonelada.....24

Figura 2: Resumo do processo de busca dos artigos.....28

Figura 3: Classes de defensivos agrícolas usados no cultivo de tomate.....31

Figura 4: A América do Sul concentra a maior parte dos produtos utilizados como forma de controle biológico.....32

Figura 5: Produtos para controle biológico de doenças do tomateiro no Brasil.....33

Figura 6: Principais cepas de bactérias relatadas como causadoras de doenças em tomate.....34

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2: ANTAGONISMO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS* FRENTE A FITOBACTÉRIAS

Figura 1: Teste de atividade antagônica em meio líquido. (1) *L. rhamnosus*. (2) *L. delbrueckii*. (3) *L. plantarum*. (4) *L. sporogenes*. (5) *L. johnsonii*. (6) *L. breve*. (7) *L. gasseri*. (8) FT1. (9) *L. helveticus*. (10) ST1. (11) FT2. (12) *L. bulgaricus*. subsp. *delbrueckii*. (13) *S. thermophilus*. (14) controle. (15) bactéria indicadora. (A) *P. carotovorum*. (B) *Xanthomonas* spp. tomate1.....56

Figura 2: Teste de atividade antagônica em meio sólido “plugs”. (1) *L. rhamnosus*. (2) *L. delbrueckii*. (3) *L. plantarum*. (4) *L. sporogenes*. (5) *L. johnsonii*. (6) *L. breve*. (7) *L. gasseri*. (8) FT1. (9) *L. helveticus*. (10) ST1. (11) FT2. (12) *L. bulgaricus*. subsp. *delbrueckii*. (13) *S. thermophilus*. (14) controle. (15) bactéria indicadora. (A) *P. carotovorum*. (B) *Xanthomonas* spp. tomate1.....56

APÊNDICE

Figura 1: Exemplo de uma matriz pronta para ser importada para o software Identax.....63

Figura 2: Tela de início do software Identax.....64

Figura 3: Exemplo de uma árvore dicotômica produzida no software Identax.....65

LISTA DE FÓRMULAS

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1: CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DO TOMATE COMO ALTERNATIVA A DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E ANTIBIÓTICOS

Equação 1: Estimativa estatística do número de mg de tóxico por kg de peso corporal.....	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LAMAB	laboratório de microbiologia ambiental e biotecnologia
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
UFG	Universidade Federal de Goiás
EA	escola de agronomia
MRS	man, rogosa e sharpe
BAL	bactérias ácido-láticas
Xuv	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
Xvc	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
Xpf	<i>Xanthomonas perforans</i>
Xgn	<i>Xanthomonas gardneri</i>
PC	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Pcor	<i>Pseudomonas corrugata</i>
X-Pim	<i>Xanthomonas</i> de pimenta
XTC	<i>Xanthomonas</i> de cana-de-açúcar
XT1	<i>Xanthomonas</i> spp. tomate1
XT2	<i>Xanthomonas</i> spp. tomate2
kDa	kilodalton
µL	microlitro
PCR	reação em cadeia da polimerase
m/Mg	milhões de megagramas
rpm	rotações por minuto
DL ⁵⁰	dose letal 50
mg/Kg p.c.	miligrama de resíduos por quilograma de peso corporal
ppm/V	partes por milhão de volume
mg/L	miligramas por litro
Kg	kilograma
L	litro
Uni	unidade
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
°C	graus centígrados
%	percentagem
pH	potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 A origem da cultura do tomate	14
2. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS	15
3. BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS DO TOMATEIRO	15
3.1 O gênero <i>Xanthomonas</i>	15
3.2 <i>Pectobacterium carotovorum</i>	16
3.3 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	16
REFERÊNCIAS	17
4. OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GERAL	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	21
6. CAPÍTULOS	22
6.1 CAPÍTULO 1 REFERENCIAL TEÓRICO	22
ARTIGO 1: CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DO TOMATE COMO ALTERNATIVA A DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E ANTIBIÓTICOS	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Seleção dos Artigos	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
6.2 CAPÍTULO 2	45
ARTIGO 2: ANTAGONISMO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE LACTOBACILLUS FRENTE A FITOBACTÉRIAS	46
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Local de realização dos experimentos	48
2.2 Isolamento de bactérias ácido-láticas (BAL) presentes em tomateiros sadios da escola de agronomia da UFG	48
2.3 Isolamento de BAL a partir de cultura starter	49
2.4 Isolamento de <i>Xanthomonas</i> spp. presentes em tomateiros doentes	49
2.5 Caracterização preliminar das cepas BAL	50

2.6 Teste de Identificação Morfotintorial.....	51
2.7 Teste de atividade antagônica em meio líquido.....	51
2.8 Teste de atividade antagônica em meio sólido - técnica dos “plugs”.....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
8. APÊNDICE.....	62
8.1 Construção da matriz com o perfil de crescimento de patovares do gênero <i>Xanthomonas</i> spp. para identificação utilizando de testes bioquímicos no software identax.....	62
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 A origem da cultura do tomate

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) anteriormente classificado como (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (JUNIOR, 2012) tem como epicentro de sua origem a América do Sul. Sua dispersão atinge pontualmente a região andina, estendendo-se por diversos países, tais como: Peru, Equador, Argentina, Colômbia, Venezuela, Bolívia e Chile (BARROS; MONZ; PICKERING, 2014). O tomateiro era cultivado nas ilhas Galápagos e, paralelamente em um ambiente em torno de 2.000 mil metros de altitude na região dos Andes (JENKINS, 1948; RICK, 1967). Foi levado pelos povos Incas para regiões a Oeste do Oceano Pacífico, com a sua domesticação e posterior cultivo, ocorrendo na América do Norte próximo ao sul do México com destaque para as áreas de Puebla e Veracruz (FERRARI, 2008).

O tomate era denominado de temistilon pelos povos Astecas e pelos nativos mexicanos de tomati, jitomate ou xitomate (EMBRAPA, 1993). A origem da palavra Tomati é oriunda de indígenas Mexicanos, mais precisamente do povo Nahuatl, ao passo que, a palavra Tomate nasceu na Espanha (FERREIRA, 2004). Estima-se que o seu ancestral mais plausível seja *L. esculentum* variety *cerasiforme* uma espécie selvagem de tomate cereja amplamente difundida por grande parte da América do Sul e América Central, com a posterior projeção do tomate cultivado até a Europa séculos depois (SIMS, 1980). No período que ocorreu o descobrimento da América, com a vinda de portugueses e dos conquistadores espanhóis, o jitomate encontrava-se bastante disperso por grande parte das regiões a Oeste do Oceano Pacífico, Atlântico, América do sul e América Central, principalmente na região do México (EMBRAPA, 1993). O tomate só chegou ao Brasil séculos depois, sendo trazido pelos italianos por volta do final do século XIX. Tornando-se apreciado de diversas formas, tanto em saladas, na forma de molhos e sopas quanto “*in natura*” (DURIGON, 2012).

Inicialmente o tomate foi equiparado com um vegetal conhecido como Mandrágora, sendo esta uma espécie de solanácea, desta forma a princípio o tomate era classificado apenas como uma outra espécie de mandrágora no velho continente. Os primeiros frutos de tomates inseridos na Europa eram de coloração amarela quando maduros justificando o nome dado

pelos italianos de *Pomi d'oro* ou *pomodoro*, desta forma sendo denominado (*golden apple*) maçã-de-ouro ou maçã dourada (SIMS, 1980). Outro nome utilizado tempos depois a parte do já citado era *poma amoris* ou maçã do amor, naquela época havia a crença que o tomate tinha propriedades afrodisíacas. Por volta de 1800, o tomate já estava amplamente disperso sendo consumido em muitos países europeus a parte da Itália (RICK; BUTLER, 1956; DURIGON, 2012).

2. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

As Bactérias ácido-láticas (BAL) formam um diversificado grupo de microrganismos, este grupo de bactérias pertencente à microbiota da mucosa normal de humanos e animais, sendo que, algumas são consideradas como probióticos, estes podem ser definidos como microrganismos vivos com capacidade de conferir proteção à saúde do seu hospedeiro (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017).

Este grupo de bactérias probióticas atuam na produção de diversas moléculas que desfavorecem a implantação e o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos, desta forma o processo de fermentação produzido por estes microrganismos juntamente com o produto do seu metabolismo a parte de conferir benefícios, sabores e aromas diferenciados, vem sendo uma das mais antigas formas de preservação de alimentos ao redor do mundo (RHEE; EUN LEE; HO LEE, 2011; GUTIERREZ et al., 2018). Dentre as moléculas produzidas pelas BAL podemos citar os Ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, como sendo as principais substâncias responsáveis pelo sucesso da inibição de outras bactérias potencialmente patogênicas (REBELLO; GASPAR, 2010; OGAKI; FURLANETO, 2015; PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2018).

3. BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS DO TOMATEIRO

3.1 O gênero *Xanthomonas*

A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas* pertence a classe *Gammaproteobacteria* que compreende diversas espécies de microrganismos. A origem da palavra *Xanthomonas* vem do grego onde, “*xanthos*” significa amarelo e “*monas*” unidade (SILVA, 2015). Esta é uma bactéria gram-negativa, baciliforme, aeróbia, flagelo polar e não formadora de esporos, suas colônias são de aspecto mucoide de coloração amarela. Estas bactérias

estão relacionadas a fitopatogênese de diferentes vegetais sendo: *Xanthomonas euvesicatoria* (Xuv), *X. vesicatoria* (Xvc), *X. perforans* (Xpf) e *X. gardneri* (Xgn), associadas ao aparecimento da mancha bacteriana em diversas famílias de vegetais, dentre estas o tomate (ALBUQUERQUE et al., 2011; RYAN et al., 2011; TEPPER et al., 2018).

Diferentes patovares de *Xanthomonas* são responsáveis pela mancha bacteriana onde, Xuv e Xgn são apontadas como patógenos de pimenta e tomate, ao passo que, Xpf é mencionada apenas nos cultivos de tomate e Xvc sendo reportada principalmente no tomate. Além disso, Xuv e Xvc são de aspecto cosmopolita. Em virtude de sua distribuição ao redor do mundo é crescente o número de epidemias relacionadas com estes microrganismos, podendo levar a grandes perdas econômicas, sobretudo da atividade de cultivo do tomate (NODA; MACHADO; MARTINS, 2003; TIMILSINA et al., 2014).

3.2 *Pectobacterium carotovorum*

A bactéria fitopatogênica de vegetais *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* hoje é denominada de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo este ubíquo patógeno de distribuição cosmopolita (CZAJKOWSK et al., 2014). Esta fitobactéria é descrita apresentando morfologia baciliforme, gram-negativa, não formadora de esporos, possuindo flagelo e com seu tamanho variando entre 0,5 a 1,0 micrômetros de altura por 1,0 até 3,0 de largura, é um microrganismo oportunista e necrotrófico, sendo o agente etiológico da podridão mole e também de murchas resultantes do processo de invasão tecidual (DUSSÁN; GIRALDO; PAZOS, 2013; LI et al., 2019).

3.3 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

O fitopatógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), é uma bactéria gram-positiva com morfologia baciliforme sendo o agente etiológico do murchamento e do cancro bacteriano, a doença causada por Cmm foi observada pela primeira vez em uma casa de vegetação no estado do Michigan, nos Estados Unidos da América por volta de 1909, ao passo que, no Brasil os primeiros relatos do cancro bacteriano do tomateiro só ocorreram em 1956, tendo seu início na região sudeste do país no estado de São Paulo (TANCOS et al., 2013; ZALUGA et al., 2013).

A epidemiologia de Cmm em áreas de constantes surtos ainda é limitada e não totalmente elucidada, visto que esta bactéria é responsável por grandes surtos em diferentes locais do mundo. Na Itália ela foi a responsável por significativas perdas no campo no ano de 2007, Cmm também foi encontrado no arquipélago das Canárias a oeste da costa do Marrocos entre os anos de 2002 a 2007. Estirpes deste patógeno também foram observadas por vários anos seguidos em locais situados entre a Bósnia e Herzegovina e a Romênia e também a leste do Egito no território de Israel, sugerindo que, devido a sua natureza heterogênea o foco inicial de Cmm pode ter diversas origens tais como; ferramentas e equipamentos contaminados, solo, sementes e também detritos de vegetais cursando com uma disseminação muito mais produtiva além de alcançar grandes distâncias através do transporte das sementes (ZALUGA et al., 2013).

REFERÊNCIAS

JUNIOR, B.P.F. **PRODUÇÃO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) REUTILIZANDO SUBSTRATOS SOB CULTIVO PROTEGIDO NO MUNICÍPIO DE IRANDUBA-AM.** 2012. 60f. Dissertação (Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal) - UNIVERSIDADE FEDERAL D AMAZONAS FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - MANAUS. 2012.

BARROS, A.; MONZ, C.; PICKERING, C. Is tourism damaging ecosystems in the Andes? Current knowledge and an agenda for future research, **Royal Swedis Academy of Sciences**, p. 1-17, 2014.

JENKINS, A.J. The Origin of the Cultivated Tomato, **ECONOMIC BOTANY**, p. 1-2, 1948.

RICK, M.C. Fruit and Pedicel Characters Derived from Galdpagos Tomatoes, **ECONOMIC BOTANY**, p. 1-14, 1967.

FERRARI, A.A. **Caracterização química de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) empregando análise por ativação neutrônica instrumental.** 2008. 151f. Dissertação (Centro de energia nuclear na agricultura, Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) - Universidade de São Paulo - 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A cultura do tomateiro (para a mesa).** Brasília: Embrapa - SPI, 1993. 92p.

FERREIRA, R.M.S. **CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DO TOMATE DEMESA (*Lycopersicon esculentum* Mill.) CULTIVADO NOS SISTEMAS CONVENCIONAL E ORGÂNICO COMERCIALIZADO NA**

REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA. 2004. 249f. Tese (Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná - CURITIBA, PR - 2004.

SIMS, L.W. HISTORY OF TOMATO PRODUCTION FOR INDUSTRY AROUND THE WORLD, *Acta Horticulturae*, p. 1-2, 1980.

DURIGON, A. **ESTUDO DA CINÉTICA DE SECAGEM DE TOMATE ITALIANO POR DIFERENTES TÉCNICAS, COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E NUTRICIONAIS E VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROCESSO.** 2012. 134f. Dissertação (Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, RS - 2012.

RICK, M.C.; BUTLER, L. Cytogenetics of the Tomato *Adv. In Gen.* n. 8, p. 1-116, 1956.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, K.R. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances, *Biomedical Journal*, Vol 40, p. 1-14, 2017.

RHEE, J.S.; LEE, E.J.; LEE, H.C. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods, *Microbial Cell Factories*. p. 1-13, 2011.

GUTIERREZ, G.E.; MAYER, J.M.; COTTER, D.P.; NARBAD, A. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials, *Gut Microbes*, Vol 10, p. 1-22, 2018.

REBELLO, P.F.D.F.; GASPAR, A. MICROORGANISMOS E SEUS METABÓLITOS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, *REVISTA AGROGEOAMBIENTAL*, p. 1-8, 2010.

OGAKI, B.M.; FURLANETO, C.M. Review: General aspects of bacteriocins, *Brazilian journal of food technology*, Vol 18, p. 1-10, 2015.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, K. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt, *Clinical Nutrition Experimental*, Vol 23, p. 1-19, 2018.

SILVA, G.S. **COMPORTAMENTO FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA DA *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO.** 2015. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. 2015.

ALBUQUERQUE, P.; CARIDADE, R.M.C.; MARCAL, R.S.A.; CRUZ, J.; CRUZ, L.; SANTOS, L.C.; MENDES, V.M.; TAVARES, F. Identification of *Xanthomonas fragariae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with Novel Markers and Using a Dot Blot Platform Coupled with Automatic Data Analysis. *American Society for Microbiology*, vol. 77, p. 1-10, 2011.

RYAN, R.P.; VORHÖLTER, F.J.; POTNIS, N.; JONES, J.B.; VAN SLUYS, M.A.; BOGDANOVE, A.J.; DOW, J.M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature reviews. Microbiology**, Vol 9, p. 1-12, 2011.

TEPER, D.; GIRIJA, A.M.; BOSIS, E.; POPOV, G.; SAVIDOR, A.; SESSA, G. The *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopAU is an active protein kinase that manipulates plant MAP kinase signaling. **PLoS pathogens**, p. 1-33, 2018.

NODA, H.; MACHADO, M.F.; MARTINS, U.L.A. SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE PIMENTÃO RESISTENTES À *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. SOB CONDIÇÕES NATURAIS DE INFECÇÃO, **ACTA AMAZONICA**, p. 1-10, 2003.

TIMILSINA, S.; JIBRIN, O.M.; POTNIS, N.; MINSAVAGE, V.G.; KEBEDE, M.; SCHWARTZ, A.; BART, R.; STASKAWICZ, B.; BOYER, C.; VALLAD, E.G.; PRUVOST, O.; JONES, B.J.; GOSS, M.E. Multilocus Sequence Analysis of *Xanthomonads* Causing Bacterial Spot of Tomato and Pepper Plants Reveals Strains Generated by Recombination among Species and Recent Global Spread of *Xanthomonas gardneri*. **American Society for Microbiology**, vol 81, p. 1-10, 2014.

CZAJKOWSK, R.; PÉROMBELON, M.C.M.; JAFRA, S.; LOJKOWSKA, E.; POTRYKUS, M.; WOLF, V.D.M.J.; SLEDZ, W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. **Annals of Applied Biology**, p. 1-21, 2014.

DUSSÁN, P.D.D.; GIRALDO, C.A.; PAZOS, L.A.S. *Bacillus thuringiensis*: en el manejo del agente de la pudrición blanda de la papa *Erwinia carotovora*. **NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas**, vol. 11, p. 1-6, 2013.

LI, L.; YUAN, L.; SHI, Y.; XIE, X.; CHAI, A.; WANG, Q.; LI, B. Comparative genomic analysis of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* SX309 provides novel insights into its genetic and phenotypic features. **BMC Genomics**, p. 1-17, 2019.

TANCOS, M.A.; CHALUPOWICZ, L.; BARASH, I.; MANULIS-SASSON, S.; SMART, C.D. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. **Applied and environmental microbiology**. Vol 79, p. 1-10, 2013.

ZALUGA, J.; STRAGIER, P.; VAERENBERGH, V.J.; MAES, M.; DE VOS, P. Multilocus variable-number-tandem-repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. **BMC microbiology**, p. 1-15, 2013.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Testar *in vitro* bactérias ácido lácticas (BAL) para o controle biológico de bactérias fitopatogênicas do tomateiro

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar bactérias ácido lácticas (BAL), a partir de tomates sadios;
- Isolar e identificar bactérias ácido lácticas (BAL), a partir de uma cultura “*starter*” mista para iogurte;
- Testar *in vitro* a capacidade antagônica das bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas, frente a fitobactérias do tomateiro visando seu controle biológico;
- Desenvolver uma matriz para identificação de *Xanthomonas* spp. baseada nas características fisiológicas e bioquímicas das mesmas, utilizando o software IDENTAX[®] para a identificação taxonômica.

5. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação apresenta-se subdividida em 2 capítulos organizados na forma de artigos científicos, estando disposta da seguinte maneira:

Capítulo 1. Artigo de revisão sistemática, referente a utilização de pesticidas e antibióticos em comparação com o controle biológico e a importância do tomate no Brasil e no mundo. A versão em inglês do artigo foi submetida em janeiro de 2021 na Revista Internacional de Ciências e encontra-se em edição

Capítulo 2. Teste de antagonismo realizado *in vitro* frente a fitobactérias do tomate. A versão em inglês do artigo foi submetida em agosto de 2021 na revista Pesquisa Agropecuária Tropical. Este artigo está em avaliação.

Apêndice. Construção da matriz com o perfil de crescimento de patovares do gênero *Xanthomonas* spp. utilizando o software IDENTAX.

6. CAPÍTULOS

6.1 CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

ARTIGO 1

Título: Controle biológico de fitopatógenos do tomate como alternativa a defensivos agrícolas e antibióticos

Autores: Rodolfo Sodré Tavares^{1*}, Paulo Alex Neves da Silva², Ludmila Batista Machado³, Abadia dos Reis Nascimento⁴, Lilian Carla Carneiro², José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, GO, Brasil.

*e-mail: free_flying_@hotmail.com

e-mail: jvieira@ufg.br

²Laboratório de Microbiologia de Microrganismos. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, GO, Brasil.

e-mail: disponnível@hotmail.com

e-mail: liliancarla@ufg.br

³Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Setor Leste Universitário, Área 4, Cep 74605-010, GO, Brasil.

e-mail: milabatistam@gmail.com

⁴Horta do setor de horticultura. Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia, Cep 74690-900, GO, Brasil.

e-mail: abadiadosreis@ufg.br

Submetido à revista: Revista Internacional de Ciências

Data da submissão do manuscrito: 04/01/2021

Status atual: Em edição

REVISÃO: CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS DO TOMATE COMO ALTERNATIVA A DEFENSIVOS AGRÍCOLAS E ANTIBIÓTICOS

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas do mundo. A China representa cerca de 25% de toda a produção mundial, sendo um dos países que mais utilizam produtos químicos, desta forma existe uma dependência e uso constante de defensivos agrícolas na cultura do tomate. A aplicação de produtos químicos proibidos em diversas partes do mundo tem como efeito colateral um grande impacto na saúde humana e no ecossistema, sendo necessário adotar outras estratégias de prevenção de doenças. Outra forma de combate às doenças do tomate é a utilização de microrganismos como forma de controle biológico, considerado uma alternativa aos defensivos agrícolas e antibióticos com maior sustentabilidade e menor toxicidade. Neste trabalho, os defensivos agrícolas mais utilizados pelos produtores foram Piraclostrobina, Mancozebe, Oxicloreto de Cobre e derivados do DDT. Para os antibióticos, Estreptomicina e Oxitetraciclina foram os mais utilizados, enquanto *Bacillus* spp. e bactérias do ácido láctico (BAL) foram os microrganismos mais citados como forma de controle biológico. Por fim, os principais fitopatógenos do tomate foram *Xanthomonas* spp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Ralstonia solanacearum*. Os objetivos deste trabalho foram identificar os principais tipos de defensivos agrícolas, antibióticos e gêneros de microrganismos utilizados no controle de doenças do tomateiro e comparar seu impacto na saúde humana e no meio ambiente.

Palavras-chave: doença do tomateiro, fitopatógenos, bactéria ácido láctica, defensivo agrícola, controle biológico

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas do mundo (CASTRO; BRANDÃO; MACEDO, 2008). Os principais países produtores de tomate do mundo em termos de produção e exportação são China, Índia, Estados Unidos da América (EUA), Turquia, Egito, Itália, Espanha e Brasil. A China representa cerca de 48% de toda a produção quando comparada aos principais países produtores, produzindo cerca de 61,6 milhões de megagramas em 2018 (Figura 1), (FAOSTAT, 2020).

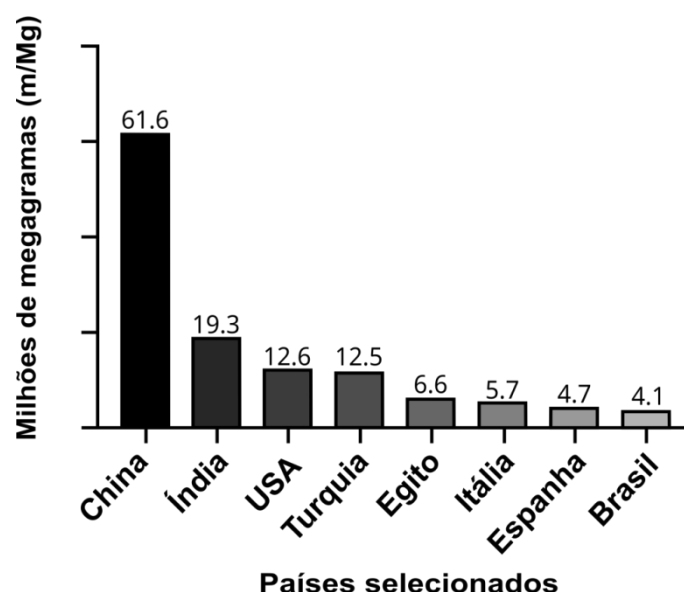


Figura 1 - O continente asiático representado pela China e Índia representa cerca de 80% da produção mundial de tomate. 1 megagrama = 1 tonelada.

Fonte: O próprio autor.

A comercialização do tomate tem forte impacto na economia de vários países, mas a suscetibilidade de alguns cultivares de tomate, os fatores ambientais e as práticas agrícolas favorecem a ocorrência de algumas doenças, tornando o tomate alvo de diversos tipos de fitopatógenos. Em escala mundial, estima-se que cerca de 35% da produção seja afetada diretamente, levando à diminuição da qualidade dos frutos e perdas no processo pós-colheita. Devido à baixa resistência do tomate, existe uma dependência e o uso constante de defensivos agrícolas na cultura do tomate (ZAVATTI; ABAKERLI, 1999; ENGINDENIZ, 2006).

No início, os defensivos agrícolas ou agrotóxicos tinham baixa solubilidade eram fortemente aderidos ao solo e, com o passar dos anos com

o aprimoramento das tecnologias, esses compostos sintéticos tornaram-se cada vez mais solúveis em água, aderindo cada vez menos ao solo e apresentando uma perfil de maior volatilidade em comparação com suas primeiras formulações, portanto, esta inovação tecnológica permitiu a manipulação e criação de compostos químicos cada vez mais tóxicos e, como efeito colateral, possuindo alto potencial para causar danos à saúde humana e ao ecossistema (VEIGA et al., 2006; IZZEDDIN; MEDINA, 2011).

Como principal estratégia de combate e prevenção de pragas e doenças, os defensivos agrícolas também podem trazer complicações para o sistema imunológico, sistema nervoso central e periférico, estando associados ao aparecimento de diversos tipos de câncer. O Brasil é um dos principais países que utilizam defensivos agrícolas no mundo, possuindo a aprovação de substâncias com diferentes espectros de ação fungicida, acaricida, herbicida e bactericida (CALDAS; SOUZA, 2000).

Outros produtos, como os antibióticos, são utilizados no controle de doenças do tomate, porém o uso de sulfato de estreptomicina, antibióticos à base de cobre ou combinações destes, nem sempre funcionam de forma satisfatória, pois quando a doença é causada por patógenos como o *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causador do cancro bacteriano e patovares de *Xanthomonas* spp. causadora da mancha bacteriana do tomate, o tratamento químico não é muito eficiente, além de causar a seleção de cepas resistentes (ITAKARO et al., 2015; XU et al., 2015).

Assim, o uso de microrganismos como forma de controle biológico é considerado uma alternativa aos defensivos agrícolas, além de antibióticos que oferecem melhor sustentabilidade e menor toxicidade (KONDOH; HIRAI; SHODA, 2000). Países como Suécia, Indonésia, Noruega, Dinamarca, Holanda e Guatemala são exemplos de países que tiveram redução anual de 35 a 75% no uso de defensivos agrícolas sem redução da produção, com destaque para a Indonésia que conseguiu diminuir a quantidade de defensivos agrícolas e utilizando o controle biológico, obtendo um aumento de 12% na produção ao longo dos anos (WILSON; TISDELL, 2001).

Neste contexto, várias cepas são indicadas no combate a diversas doenças do tomateiro, como bactérias do ácido láctico (BAL), *Rizobactérias*

promotoras de crescimento, *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* spp., Bacteriófagos, entre outras. Portanto, o uso de controle biológico é uma opção viável para defensivos agrícolas e antibióticos (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018; MARIN *et al.*, 2019).

Assim, os objetivos deste trabalho foram identificar os principais tipos de defensivos agrícolas, antibióticos e gêneros de microrganismos utilizados no controle de doenças do tomateiro e comparar seus impactos na saúde humana e no meio ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo de revisão sistemática de periódicos e artigos indexados. A busca foi realizada entre janeiro de 2020 e junho de 2020, quando ocorreu a busca nas bases de dados ScienceDirect, Pubmed / Medline e Scielo, sem delimitação de tempo.

A busca na base de dados foi realizada da seguinte forma: na base de dados ScienceDirect e Pubmed, as palavras-chave utilizadas foram "Biological control", "Lactobacillus", "Antibiotic", "Tomato biological control", "Chemical control of tomato", "tomato disease", "Aplicação de pesticidas e tomate", "Bactérias probióticas", "Antibióticos e tomate", "Patógenos de plantas", "Bactérias fitopatogênicas", "Animal", "Gen". Para a base de dados Scielo, os descritores tiveram que ser adaptados pela limitação do mecanismo de busca, apenas os dois últimos descritores foram omitidos. Os seguintes operadores booleanos foram usados: OR, AND e NOT.

Os critérios de inclusão foram trabalhos publicados e disponíveis integralmente em banco de dados científico na modalidade online, trabalhos que abordem o controle biológico por meio de microrganismos probióticos (bactérias, fungos e vírus), uso de agrotóxicos ou antibióticos como métodos químicos como forma de controle de doenças do tomate. Os critérios de exclusão foram estudos que avaliam o controle de doenças do tomate por outros métodos, estudos publicados na forma de pôsteres e artigos que apresentam avaliações inconclusivas. Os trabalhos considerados elegíveis foram lidos na íntegra e os dados disponíveis no texto foram extraídos de

acordo com os seguintes critérios: Autor, ano de publicação e método de controle utilizado.

Além dos bancos de dados citados, foram consultados os bancos de dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (EMBRAPA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que fornecem dados e regulamentações sobre o controle químico e biológico no Brasil, foram utilizadas como fonte de pesquisa.

2.1 Seleção dos Artigos

A busca realizada por meio da implantação do protocolo retornou um total de 943 artigos, dos quais 753 foram excluídos após a análise preliminar. Dos 190 artigos restantes, 31 não atenderam aos critérios de inclusão. Cento e cinquenta e nove artigos foram selecionados para análise detalhada do título e resumo e os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados paralelamente. Cento e trinta e um artigos filtrados foram selecionados e seus textos lidos na íntegra. Por fim, 40 estudos foram selecionados para fazer parte deste artigo de revisão. A Figura 2 apresenta o resumo do processo de busca dos artigos.

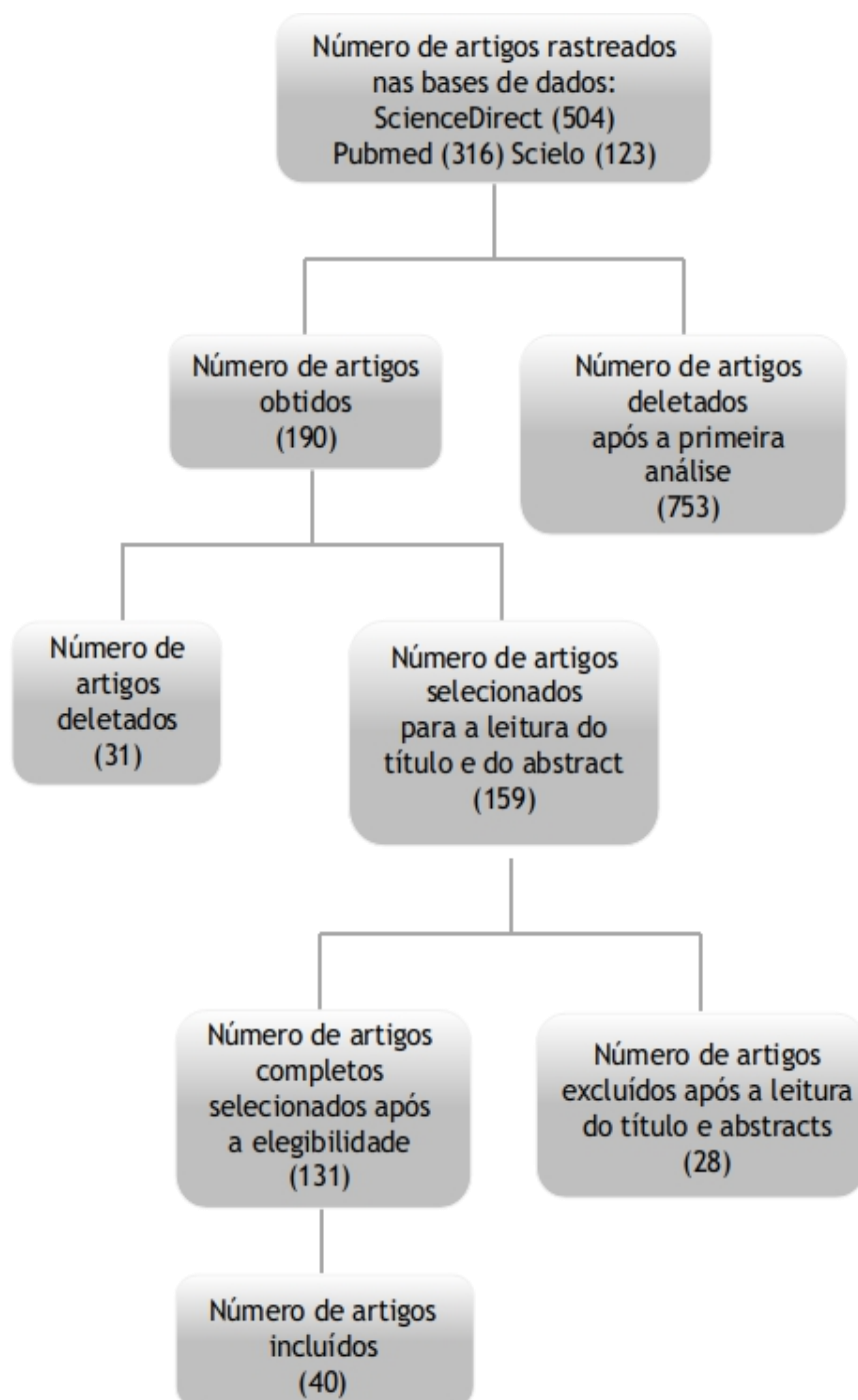


Figura 2 - Resumo do processo de busca dos artigos.
Fonte: Adaptado de *Silva et al.* (2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo dados divulgados pela EMBRAPA, os defensivos agrícolas são classificados pela ANVISA de acordo com seu grau de toxicidade com base em seus efeitos agudos.

Esses produtos são classificados com base na dose letal 50 (DL50), que tem como parâmetro a dose necessária para matar 50% da população de animais utilizada nos experimentos (muitas vezes ratos e camundongos), em um período de aproximadamente 2 semanas (BONVOISIN et al., 2020). Para o Ministério da Saúde (MSB), os defensivos agrícolas baseiam-se no DL50 oral de formulações líquidas e sólidas, enquanto para a Organização Mundial da Saúde (OMS) a classe toxicológica também se baseia no DL50, mas na forma oral e dérmica, por mg / kg de peso de formulações líquidas e sólidas (ANVISA, 2019; BONVOISIN et al., 2020).

Embora as duas entidades apresentem certas mudanças, em ambos os casos os defensivos agrícolas são classificados como segue com base na DL50; Classe I - extremamente tóxico (faixa vermelha); classe II - altamente tóxico (faixa amarela); classe III - moderadamente tóxico (faixa azul) e classe IV - pouco tóxico (faixa verde), (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação toxicológica aguda por via oral, cutânea e inalatória (DL₅₀)

Classe		Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV
Grau de toxicidade		Extremamente Tóxico	Altamente Tóxico	Moderadamente Tóxico	Pouco Tóxico
Cor atribuída		Vermelho	Amarelo	Azul	Verde
Via de exposição oral	unidade ¹ (mg/Kg p.c.)	≤ 5	>5 - 50	>50 – 300	>300- 2000
Via de exposição cutânea	¹ (mg/Kg p.c.)	≤ 50	>50 - 200	>200 - 1000	>1000- 2000
Via de exposição à inalação	Gases ² (ppm/V)	≤ 100	>100 - 500	>500 - 2500	>2500-20000
	Vapores ³ (mg/L)	≤ 0,5	> 0,5 - ≤ 2,0	>2,0 - ≤ 10	> 10 ≤ 20

Classificação toxicológica atribuída a diferentes vias de exposição. Legenda: 1. miligrama de resíduos por quilograma de peso corporal, 2. partes por milhão de volume, 3. miligramas por litro.

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Adaptado de ANVISA 2019).

Vale ressaltar que, devido ao novo marco regulatório do uso de defensivos agrícolas no Brasil, muitos produtos estão em processo de reclassificação, porém sem alteração na toxicidade do produto final. O novo marco regulatório traz, entre outras mudanças, um aprimoramento das informações que chegam ao produtor rural, aprimorando o rótulo do produto com uma linguagem mais acessível, visando mitigar os impactos negativos à saúde e ao meio ambiente, fazendo com que o Brasil siga o Globalmente Harmonizado Sistema de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). Entretanto, como resultado dessa fase de transição, será adotada a classificação por faixas (ANVISA, 2019).

A quantidade e o uso desses defensivos agrícolas variam de acordo com a demanda de cada produtor e sua classificação de acordo com o espectro de ação pode ser a seguinte; acaricida / fungicida, bactericida, espalhador de adesivo e fungicida conforme certificado de registro (Tabela 2).

Table 2 - Principais grupos de agrotóxicos utilizados em plantações de tomate no Brasil

Grupo				Acaricida/Fungicida
Nome comercial	¹Uni	Princípio ativo	Classe toxicológica/Legenda	
Dithane WG NT	² Kg	mancozebe	I Extremamente Tóxico	Red
Manzate WG	Kg	mancozebe	I Extremamente Tóxico	
Gravuni	Kg	cyprodinil	I Extremamente Tóxico	
Tradecorp 480 EC	³ L	chlorpyrifos	I Extremamente Tóxico	
Meothrin 300	L	fenpropathrin	I Extremamente Tóxico	
Terrazole 350 WP	Kg	etridiazole	I Extremamente Tóxico	
Mancozebe CCAB	Kg	mancozebe	II Altamente Tóxico	Yellow
Abamectin Nortox	Kg	abamectina	II Altamente Tóxico	
Thiodan CE	L	endossulfam	II Altamente Tóxico	
Evolution	Kg	acefato	III Medianamente Tóxico	Blue
Pirate	L	chlorfenapyr	III Medianamente Tóxico	
Vertimec 18 EC	L	abamectina	III Medianamente Tóxico	
Assist	L	óleo mineral	IV Pouco Tóxico	Green
Grupo				Bactericida
Nome comercial	Uni	Princípio ativo	Classe toxicológica/Legenda	
Scooter	Kg	mancozebe + oxicleto de cobre	I Extremamente Tóxico	Red
Kocide Bioactive	Kg	hidróxido de cobre	III Medianamente Tóxico	
Cobre Atar BR	Kg	óxido cuproso	IV Pouco Tóxico	Green
Reconil	L	oxicleto de cobre	IV Pouco Tóxico	
Recop	Kg	oxicleto de cobre	IV Pouco Tóxico	
Grupo				Espalhante adesivo
Commercial name	Uni	Princípio ativo	Classe toxicológica/Legenda	
Adesil	L	ethoxylated nonylphenol	I Extremamente Tóxico	Red
Grupo				Fungicida
Nome comercial	Uni	Princípio ativo	Classe toxicológica/Legenda	

Cercobin 700 WP	Kg	thiophanate-methyl	I Extremamente Tóxico
Forum Plus	Kg	dimethomorph	I Extremamente Tóxico
Galben-M	Kg	benalaxyl + mancozeb	I Extremamente Tóxico
Orthocide-500	Kg	captan	I Extremamente Tóxico
Thiobel 500	Kg	cartap hydrochloride	I Extremamente Tóxico
Bravonil Ultrex	Kg	chlorothalonil	I Extremamente Tóxico
Daconil WG	Kg	chlorothalonil	I Extremamente Tóxico
Folio Gold 440 SC	Kg	chlorothalonil + metalaxyl-M	I Extremamente Tóxico

Principais classes de defensivos agrícolas e sua classificação toxicológica, onde a maioria dos defensivos agrícolas utilizados no plantio de tomate no Brasil variam entre as classes I, III e IV. * Para uma melhor comparação considere 1Kg = 1L. Legenda: 1. Unidade 2. Quilograma, 3. Litros.

Fonte: Adaptado do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários AGROFIT 2008.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, foi possível mensurar os defensivos agrícolas mais utilizados nas plantações de tomate de acordo com a classificação e seu grau de toxicidade.

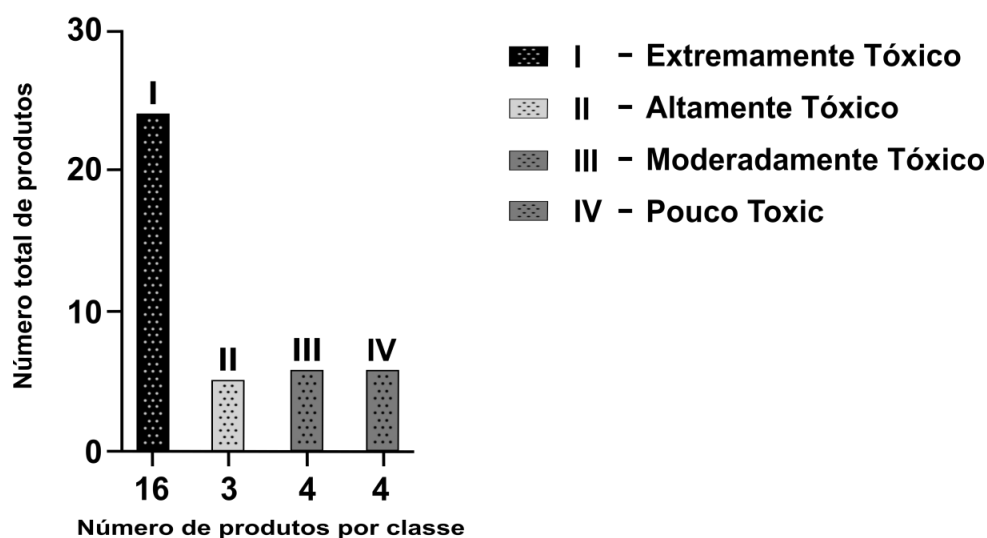


Figura 3 - Classes de defensivos agrícolas usados no cultivo de tomate.

Fonte: o próprio autor.

Apesar da grande quantidade de produtos químicos destinados ao combate às doenças do tomate, existem várias alternativas aos defensivos agrícolas, neste sentido alguns dos produtos utilizados como forma de controle biológico são apresentados na (Tabela 3) (BETTIOL et al., 2012; SOLANKI et al., 2015).

Tabela 3 - Principais agentes de controle biológico utilizados em plantações de tomate no Brasil e no mundo

Nome comercial	Princípio ativo	Registro / marketing
Nemata	<i>Paecilomyces lilacinus</i> DSM 15169	Colômbia
Agrotrich and Agrotech Plus ECO-77	<i>Trichoderma</i> spp ¹ (6x) <i>Trichoderma harzianum</i> cepa B77	Brasil (registro temporário) África do sul, Quênia e Zâmbia
Ecotrich ES	<i>Trichoderma harzianum</i>	Brasil (registro temporário)
Sentinel - Trichoprotection	<i>Trichoderma atroviride</i> LC52	Nova Zelândia
Trichodel	<i>Trichoderma</i> spp.	Brasil
Trichonativa	<i>Trichoderma virens</i> cepa Sherwood Nativa, <i>Trichoderma harzianum</i>	Chile
Trichozam	<i>Trichoderma</i> spp.	Honduras
Amylo-X	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	Itália
Botrybell	<i>Bacillus velezensis</i>	Espanha
Nacillus	<i>Bacillus</i> spp. e <i>Brevibacillus brevis</i>	Chile
RhizoVital	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	Alemanha

Principais microrganismos utilizados no controle biológico específico do tomate. Os produtos Botrybell e Bacillus são especificamente para fitopatógenos. O Brasil possui três produtos, dois deles com registro apenas temporário. Legenda: 1. seis cepas diferentes de Trichoderma.

Fonte: Adaptado de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - EMBRAPA (2012).

Foi realizado um levantamento em 10 países selecionados sobre o registro de produtos utilizados como forma de controle biológico na América do Norte, América Central, América do Sul, Europa e Oceania (Figura 4).

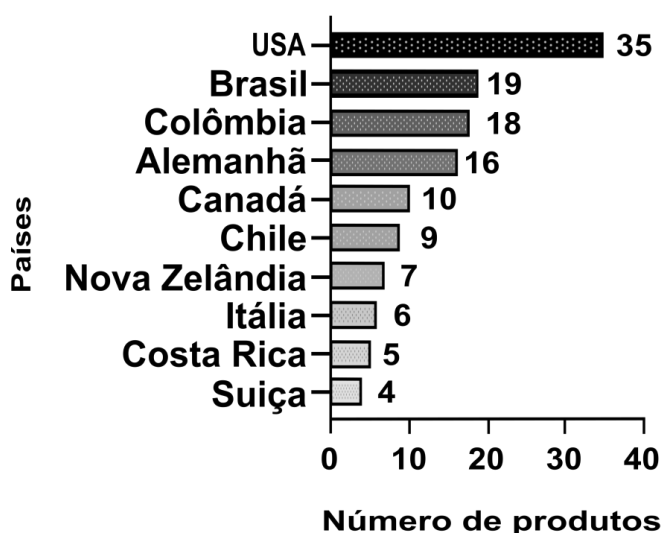


Figura 4 - A América do Sul concentra a maior parte dos produtos utilizados como forma de controle biológico.

Fonte: o próprio autor.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3 e na Figura 4, apesar dos 19 produtos para controle biológico registrados no Brasil, apenas três são destinados ao uso em tomate, dois dos quais receberam apenas um registro temporário (Figura 5).



Figura 5 - Produtos para controle biológico de doenças do tomateiro no Brasil.
Fonte: o próprio autor.

Após análise criteriosa dos 40 artigos selecionados para a composição deste artigo de revisão, foram selecionados os principais defensivos agrícolas e as principais cepas de agentes biológicos utilizados pelos produtores. Por fim, a busca por palavras-chave nos artigos selecionados resultou em maior frequência para produtos à base de cobre, DDT, Piraclostrobina e Mancozebe como os principais defensivos agrícolas utilizados no controle químico do tomate (Tabela 4).

Tabela 4 - Principais produtos químicos e biológicos utilizados no controle de doenças do tomate

Defensivos agrícolas	Referências
Oxicloreto de cobre *	ITAKARO <i>et al.</i> , 2015; VEIGA <i>et al.</i> , 2006; ARNOLD <i>et al.</i> , 2004.
Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) *	OLISAH <i>et al.</i> , 2020; MEFTAUL <i>et al.</i> , 2020; WILSON; TISDELL, 2001; VEIGA <i>et al.</i> , 2006; BHANDARI <i>et al.</i> , 2020.
Piraclostrobina *	ITAKARO <i>et al.</i> , 2015.
Mancozebe *	ENGINDENIZ, 2006; CALDAS <i>et al.</i> , 2000.
Diazinon	ENGINDENIZ, 2006; MEFTAUL <i>et al.</i> , 2020; CALDAS <i>et al.</i> , 2000.
Dieldrin	OLISAH <i>et al.</i> , 2020; WILSON;

Dimethoate	TISDELL, 2001.
Heptachlor	ENGINDENIZ, 2006; CALDAS <i>et al.</i> , 2000; ANDRADE <i>et al.</i> , 2015.
Hexachlorocyclohexane	OLISAH <i>et al.</i> , 2020; OROZCO <i>et al.</i> , 2017.
	OLISAH <i>et al.</i> , 2020; MEFTAUL <i>et al.</i> , 2020.

Agentes de controle biológico	Referências
<i>Bacillus</i> spp.	SHODA <i>et al.</i> , 2000.
BAL	MARIN <i>et al.</i> , 2019.

(*) Representa a frequência dos produtos químicos mais adotados pelos produtores. BAL - bactérias do ácido láctico. Estirpes de *Bacillus* spp. e BAL são identificados como as principais formas de controle biológico em doenças como a mancha bacteriana.

Fonte: o próprio autor.

Nesta pesquisa, as principais cepas de fitopatógenos causadores de doenças em tomates foram *Xanthomonas perforans*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, responsável por causar a mancha bacteriana (BLAINSKI *et al.*, 2018), *Ralstonia* spp. causando podridão mole e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* com infecção de semente (YENDYO; RAMESH; PANDEY, 2017), (Figura 6).

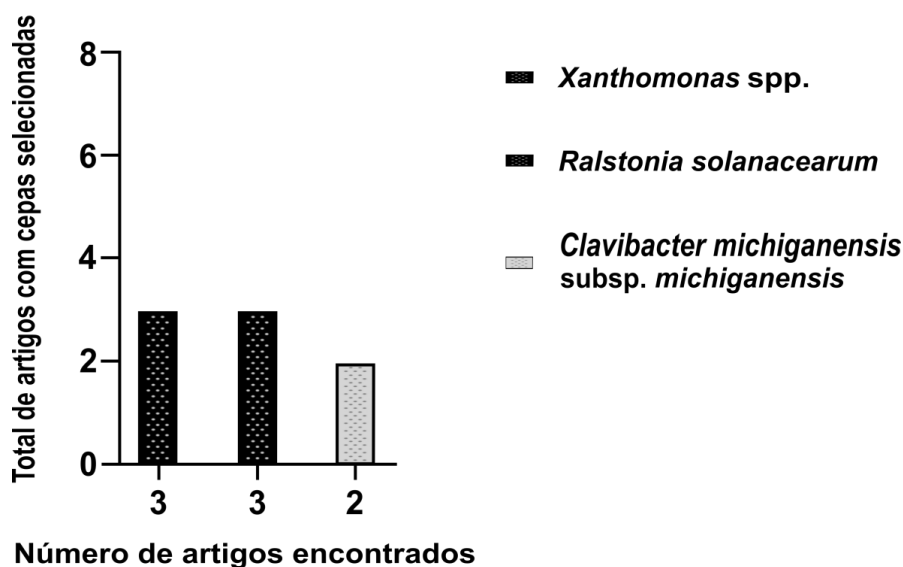


Figura 6 - Principais cepas de bactérias relatadas como causadoras de doenças em tomate.
Fonte: o próprio autor.

De acordo com estudos publicados, apenas dois artigos relataram o uso de fagos como meio de controle biológico de doenças do tomate (ADDY *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2019).

O efeito prejudicial da exacerbação do uso de defensivos agrícolas tem sido um dos tópicos mais relevantes discutidos em todo o mundo nas últimas décadas (MEFTAUL *et al.*, 2019). Esses compostos químicos

utilizados em larga escala na agricultura podem ser deslocados por longas distâncias do local inicialmente pulverizado, afetando o meio ambiente, os animais domésticos, a natureza e também o homem, exigindo estudos sobre os efeitos e interações toxicológicas entre homem, meio ambiente e estes compostos (OLISAH; OKOH O; OKOH I, 2020).

Assim, esses defensivos agrícolas recebem uma determinada classificação toxicológica de acordo com o órgão regulador de cada país, no Brasil a ANVISA é responsável pela classificação relacionada aos humanos (Tabela 1) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) é responsável para pesquisas sobre toxicidade ao meio ambiente (UYEMURA et al., 2017; ANVISA, 2019). Mundialmente, a OMS classifica esses produtos com base no DL50 em ratos, oral e dérmico, por mg / kg de peso de formulações líquidas e sólidas, de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante e caso não seja possível obter esses dados a partir da classificação é realizado em proporção aos valores de DL50 (BONVOISIN et al., 2020). Na tentativa de padronizar o uso das diversas formas de controle, foram elaborados protocolos, de acordo com a seguinte fórmula segundo a OMS (2019).

$$\frac{DL^{50}_{\text{composto ativo}} \times 100}{\text{Porcentagem do composto ativo na formulação}}$$

Equação (1)

O valor DL50 é uma estimativa estatística do número de mg de tóxico por kg de peso corporal necessário para ceifar 50% de uma determinada população de animais de experimento.

No caso de fórmulas contendo mais de um produto químico (princípio ativo, solventes, etc.), se a toxicidade do produto final aumentar, a classificação toxicológica deve representar o total dessa combinação (OMS, 2019), conforme o caso com alguns defensivos agrícolas mostrados na Tabela 2.

A regulamentação desses produtos é importante porque grande parte dos defensivos agrícolas utilizados pelos produtores rurais oferece alto grau de toxicidade, como pode ser visto na Tabela 2 e Figura 3. Em seus estudos, Engindeniz (2005), relata que além do Brasil, alguns agricultores na Turquia utilizam uma quantidade desproporcional de defensivos agrícolas temendo perder a safra. Os principais defensivos agrícolas relatados neste estudo

foram oxalato de hidrogênio (Evisect), lambda cialotrina (Karate), imidaclopride (Confidor), dimetoato (Poligor), basudina 60 EM (Diazinon), propinebe (Antracol), metalaxil mancozebe (Ridomil), trifluralin (Treflan) e abamectina (Agrimec).

De acordo com a OMS (2019), eles representam um alto grau de toxicidade, e seu uso, mesmo que controlado ou principalmente indiscriminado, pode colocar em risco a vida de pessoas, animais e o meio ambiente (OLISAH; OKOH; OKOH, 2020). Uma alternativa viável é o uso de BAL como forma de controle biológico (KONDOH; HIRAI; SHODA, 2000).

Outro fator relevante é o uso de produtos que já foram proibidos e ainda são comercializados devido ao seu preço relativamente barato, como é o caso do carbendazim e dietofencarbe (LI et al. 2016), Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) os isômeros hexaclorociclohexano proibidos da Índia e outros países asiáticos (MEFTAUL et al. 2019), e o brometo de metila que deveria ser banido até 2005 de acordo com o protocolo de Montreal por causar depleção na camada de ozônio (SANDE et al., 2011).

Da mesma forma, pequenos produtores e operadores de equipamentos acreditam que o uso exacerbado de defensivos agrícolas de baixa qualidade, geralmente por serem mais baratos, gera melhores resultados (Quirós et al. 2017), porém, esses produtos podem causar problemas como queimaduras, irritações na pele, vômitos e dores de cabeça, sendo relatados em mais da metade dos entrevistados pelo grupo de (NÁJERA et al. 2011) e quase todos, ao sofrerem alguma intoxicação no campo, consumiam suco de limão ou leite como forma de antídoto.

Esse dado é importante porque o nível técnico do produtor e dos trabalhadores pode refletir sobre severas comorbidades ocupacionais, ambientais e comorbidades que extrapolam as comunidades onde o produto é gerado, colocando em risco as famílias que participam do processo produtivo e também outros consumidores. Dessa forma, parte do impacto ambiental e de produtos com alto grau de toxicidade podem ser mitigados por meio de treinamento aos agricultores, utilizando boas práticas agrícolas e eliminando ou reduzindo produtos das classes mais tóxicas (ARAÚJO; NOGUEIRA; AUGUSTO, 2000).

Apesar da existência de produtos menos tóxicos à saúde humana (classe IV), os defensivos agrícolas à base de cobre com amplo espectro de ação identificados na Tabela 2, possuem um impacto significativo no meio ambiente, assim de acordo com os estudos de Arnold et al. (2004) e Meftaul et al. (2019), o cobre é tóxico para embriões de certos animais aquáticos podendo prejudicar a vida marinha, causar carcinoma urotelial em cães, envenenamento de pássaros e morte de insetos não-alvo devido ao uso indevido.

Embora a maioria dos agricultores opte pelo uso de produtos químicos como defensivos agrícolas e antibióticos, existem outros produtos voltados para as inúmeras doenças na cultura do tomate e menos agressivos para produtores e consumidores, o uso de microrganismos vivos como forma de controle biológico em certos casos são tão eficientes quanto o controle químico, portanto o uso desses compostos nem sempre se justifica e apesar do número reduzido de produtos biológicos em relação aos defensivos agrícolas, existem várias alternativas voltadas apenas para o tomate, como pode ser visto na Tabela 3.

A utilização de *Rhizobacteria* e *Bacillus* sp. utilizado como controle biológico da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (YAMAMOTO et al., 2015; WU et al., 2016) e outros patógenos tiveram resultados proporcionais ao indutor químico de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) relatado por Rocha; Moura, (2013) e Itakaro e colaboradores (2015), por serem eficientes no combate às cepas do gênero *Xanthomonas*. Corroborando com esses dados, Marin et al. (2019), relatam o uso de bactérias ácido láctica (BAL), Serenade® OPTI-BAYER (uma única cepa de *Bacillus subtilis* cepa QST 713) e AgriPhage™ (Bacteriófago) como microrganismos usados com sucesso contra vários patovares de *Xanthomonas* spp.

Portanto, embora as soluções baseadas no controle biológico sejam menores do que as formulações baseadas em defensivos agrícolas (Tabela 4), existem vários produtos em outros países (Figura 4) que apresentam boas alternativas para importantes patógenos do tomate (Figura 6). No Brasil, são poucos os produtos registrados voltados apenas para o combate às doenças do tomate (Figura 5). Embora a maioria dos dados aponte para testes

realizados “*in vitro*” como os de Rocha; Moura, (2013), o controle biológico ainda é viável porque, segundo Duval et al. (2003) e Itako et al. (2015) o uso de certos tipos de defensivos agrícolas, como derivados de cobre e antibióticos, como estreptomicina e oxitetraciclina, nem sempre oferecem controle satisfatório da doença ou patógeno, como *Xanthomonas* spp. o que pode resultar na seleção de isolados bacterianos resistentes.

4. CONCLUSÃO

O cultivo do tomate representa grande valor econômico para diversos países, possuindo uma ampla gama de produtos derivados, porém, algumas espécies cultivadas são suscetíveis a diversos patógenos. Portanto, a maior parte do tratamento de doenças é realizada por meio de produtos como defensivos agrícolas e antibióticos.

Neste trabalho, os defensivos agrícolas mais relatados pelos produtores foram Oxicleto de cobre, produtos derivados do DDT, Piraclostrobina e Mancozebe, todos pertencentes à classe mais tóxica. Para a classe de antibióticos, estreptomicina e oxitetraciclina foram relatadas como sendo mais utilizadas. Os agentes de controle biológico mais citados neste trabalho foram bactérias lácticas e *Bacillus* spp. Apenas dois estudos relataram o uso de bacteriófagos como forma de controle biológico.

Em relação à toxicidade causada ao homem e ao meio ambiente, alguns defensivos agrícolas têm sido associados à contaminação da vida marinha, ao surgimento de diversos tipos de câncer em humanos e animais domésticos e a depleção da camada de ozônio. Os antibióticos têm sido associados ao surgimento de isolados bacterianos resistentes e à contaminação da água por meio de resíduos. Foi relatado que alguns agentes de controle biológico têm eficácia semelhante a certos produtos químicos. Não foram encontrados dados relacionados à toxicidade em humanos e animais por antibióticos ou agentes de controle biológico. Os dados de velocidade de resposta ao tratamento não foram avaliados em comparação aos produtos químicos.

Por fim, são necessários mais estudos “*in vivo*” sobre agentes de controle biológico para melhor tomada de decisão por parte dos produtores, além de melhores práticas agrícolas como a não utilização de defensivos

agrícolas proibidos do mercado e melhor planejamento, países como Indonésia, Holanda e Guatemala são exemplos de que agentes de controle biológico podem servir como alternativa ou diminuição de produtos químicos.

REFERÊNCIAS

ADDY, H. S.; ASKORA, A.; KAWASAKI, T.; FUJIE, M.; YAMADA, T. Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Plant Disease**, v.96, n.8, p.1204-1209, 2012. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30727062/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1094/PDIS-12-11-1023-RE.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Available from: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Accessed: JUN. 6, 2020.

ANDRADE, G. C. R. M.; MONTEIRO, S. H.; FRANCISCO, J. G.; FIGUEIREDO, L. A.; ROCHA, A. A.; TORNISIELO, V. L. Effects of types of washing and peeling in relation to pesticide residues in tomatoes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.26, n.10, p.1994-2002, 2015. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532015001001994>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.5935/0103-5053.20150179J.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 294, de 29 de Julho de 2019. Critérios para avaliação e classificação toxicológica - AGO. 8, 2020. Available from: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/#/visualizar/403290>>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC N° 296, DE 29 DE JULHO DE 2019. Critérios para avaliação e classificação toxicológica - MAY. 8, 2021. Available from: <<https://www.documentador.pr.gov.br/documentador/pub.do?action=d&uuiid=@gtf-escriba-sesa@60e76574-3f03-4289-a2f2-f2ef361db6d1&empPg=true>>.

ARAÚJO, A. C. P.; NOGUEIRA, D. P.; AUGUSTO, L. G. S. Impacto dos praguicidas na saúde: Estudo da cultura de tomate. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.3, p.309-313, 2000. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102000000300016&script=sci_abstract&tlng=pt>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1590/S0034-89102000000300016.

ARNOLD, G. L.; LUCKENBACH, M. W.; UNGER, M. A. Runoff from tomato cultivation in the estuarine environment: Biological effects of farm management practices. **Journal of Experimental Marine Biology And Ecology**, v.298, n.2, p.323-346, 2004. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098103003666?via%3Dihub>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/S0022-0981(03)00366-6.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; JÚNIOR, T. J. P.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente** (Documentos 88). 2012. 156p.

BHANDARI, G.; ATREYA, K.; SCHEEPERS, P. T. J.; GEISSEN, V. Concentration and distribution of pesticide residues in soil: Non-dietary human health risk assessment. **Chemosphere**, v.253, p.1-13, 2020. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32289601/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126594.

BLAINSKI, J. M. L.; NETO, A. C. R.; SCHIMIDT, E. C.; VOLTOLINI, J. A.; ROSSI, M. J.; PIERO, R. M. Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* induce biochemical and physiological alterations in tomato plant against bacterial spot. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.11, p.4741-4753, 2018. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29656378/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1007/s00253-018-8946-0.

BONVOISIN, T.; UTYASHEVA, L.; KNIPE, D.; GUNNEL, D.; EDDLESTON, M. Suicide by pesticide poisoning in India: a review of pesticide regulations and their impact on suicide trends. **BMC Public Health**, v.20, p.1-16, 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7031890/>>. Accessed: MAY. 5, 2021. doi: 10.1186/s12889-020-8339-z.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. Chronic dietary risk assessment for pesticide residues in Brazilian food. **Journal of public health**, v.34, n.5, p.529-537, 2000. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15764334/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1080/02652030400009225.

CASTRO, I. M.; BRANDÃO, E. S.; MACEDO, J. R. Aspectos funcionais e nutricionais do tomate. Uso de agrotóxicos na tomaticultura de São José de Ubá (RJ). **Embrapa Agroindústria de Alimentos** (Documentos 95) p. 1-32, 2008.

DUVAL, A. M. Q.; FILHO, A. G.; JÚNIOR, R. P. L.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.4, p.15-24, 2003. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362003000400020>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400020>.

ENGINDENIZ, S. Economic analysis of pesticide use on processing tomato growing: A case study for Turkey. **CROP PROTECTION**, v.25, n.6, p.534-541, 2006. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S02612194050022675>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/j.cropro.2005.08.009.

FAO - **FAOSTAT** - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from: <<http://faostat.fao.org/>>. Accessed: ABR. 4, 2020.

GE, B.; LIU, B.; NWET, T. T.; ZHAO, W.; SHI, L.; ZHANG, K. *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, Isolated from changbai mountain, China, Has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. **PLOS ONE**, v. 11, n.11, p.1-13, 2016. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27832162/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0166079.

GUIMARÃES, A.; SANTIAGO, A.; TEIXEIRA, J. A.; VENÂNCIO, A.; ABRUNHOSA, L. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.264, p.31-38, 2018. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29107194/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.025.

ITAKO, A. T.; JÚNIOR, J. B. T.; JÚNIOR, T. A. F. S.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Chemical products induce resistance to *Xanthomonas perforans* in tomato. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p.701-706, 2015. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26413050/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1590/S1517-838246320140177.

IZZEDDIN, N. A.; MEDINA, L. T. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. **Salus**, v.15, n.3, p.8-18, 2011. Available from: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382011000300005>. Accessed: JUN. 6, 2020.

KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.91, n.2, p.173-177, 2001. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16232970/05>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80061-x.

LI, H.; DU, H.; FANG, L.; DONG, Z.; GUAN, S.; FAN, W.; CHEN, Z. Residues and dissipation kinetics of carbendazim and diethofencarb in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and intake risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.77, p.200-205, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230016300563?via%3Dihub>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.03.012.

MARIN, V. R.; FERRAREZI, J. H.; VIEIRA, G.; SASS, D. C. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.5, p.1-7, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31011844/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1007/s11274-019-2646-5.

MEFTAUL, I.; VENKATESWARLU, K.; DHARMARAJAN, R.; ANNAMALAI, P.; MEGHARAJ, M. Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door, **Science of the Total Environment**, v.711, p.1-55, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31810707/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134612.

NÁJERA, R. E. R.; NÁJERA, J. A. R.; GONZALEZ, S. G.; LUNA, E. J. P. Manejo y control de plagas del cultivo de tomate en Cintalapa, Chiapas, Mexico. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v.27, n.2, p. 129-137, 2011. Available from:

<http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-4999201100020004>. Accessed: JUN. 6, 2020.

OLISAH, C.; OKOH, O. O.; OKOH, A. I. Occurrence of organochlorine pesticide residues in biological and environmental matrices in Africa: A two-decade review. **Heliyon**, v.6, n.3, p.1-25, 2020. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844020303637>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03518.

OROZCO, F. D. A.; GALLÓN, L. M. L.; FANDIÑO, M. I. P.; OROZCO, A. L.; CIFUENTES, J. A. G. Phytosanitary residuality in tomato and cape gooseberry grown in Quindío (Colômbia). **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v.18, n.3, p.571-582, 2017. Available from: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062017000300571&lang=pt>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.21930/rcta.vol18_num3_art:745.

QUIRÓS, A. D.; LUTZ, M. I. G.; HERNÁNDEZ, G. V.; ACEDO, D. M. Situaciones de riesgo potencial relacionadas con la aplicación de agroquímicos en los sistemas hortícolas. **Agronomía Costarricense**, v.41, n.2, p.67-77, 2017. Available from: <https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242017000200067&lang=pt>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.15517/rac.v41i2.31300.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.5, p.423-430, 2013. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762013000500007&script=sci_abstract&tlng=pt>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000025>.

SANDE, D.; MULLEN, J.; WETZSTEIN, M.; HOUSTON, J. Environmental impacts from pesticide use: A case study of soil fumigation in Florida tomato production. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, n.12, p.4649-4661, 2011. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290991/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.3390/ijerph8124649.

SHOKRYAZDAN, P.; JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B.; HO, Y. W. Probiotics: From Isolation to Application. **Journal of the American College of Nutrition**, v.36, n.8, p.666-676, 2017. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28937854/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1080/07315724.2017.1337529.

SILVA, P. A. N.; ITO, C. R.; BARBOSA, M. S.; SANTOS, M. O.; CARNEIRO, L. C. Arboviruses (chikungunya, dengue, and Zika) associated with ophthalmic changes: a focus on aqueous fluid and vitreous humor. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.39, n.5, p.827-833, 2019. Available from:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31863236/>>. Accessed: JUN. 2, 2020. doi: 10.1007/s10096-019-03792-9.

SOLANKI, M. K.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, S.; KASHYAP, P. L.; SRIVASTAVA, A. K. Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus* strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Journal of Basic Microbiology**, v.55, n.1, p.82-90, 2015. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24277414/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1002/jobm.201300528.

UYEMURA, S. A.; STOPPER, H.; MARTIN, F. L.; KANNEN, V. A Perspective Discussion on Rising Pesticide Levels and Colon Cancer Burden in Brazil. **Frontiers in public health**, v.5, p.1-8, 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5650604/>>. Accessed: MAY. 5, 2021. doi:10.3389/fpubh.2017.00273.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de saúde pública**, v.22, n.11, p.2391-2399, 2006. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2006001100013&script=sci_abstract>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1590/s0102-311x2006001100013.

WANG, X.; WEI, Z.; YANG, K.; WANG, J.; JOUSSET, A.; XU, Y.; SHEN, Q.; FRIMAN, V. P. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato. **Nature Biotechnology**, v.37, n.12, p.1513,1520, 2019. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31792408/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1038/s41587-019-0328-3.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, v.39, n.3, p.449-462, 2001. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921800901002385>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1016/S0921-8009(01)00238-5.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Who recommended classification of pesticides by hazard. Switzerland: **WHO**; 2019. Available from: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>>. Accessed: AGO. 8, 2020.

WU, K.; FANG, Z.; WANG, L.; YUAN, S.; GUO, R.; SHEN, B.; SHEN, Q. Biological potential of bioorganic fertilizer fortified with bacterial antagonist for the control of tomato bacterial wilt and the promotion of crop yields. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.10, p.1755-1764, 2016. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27381335/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.4014/jmb.1604.04021.

XU, X.; KUMAR, A.; DEBLAIS, L.; MIMBELA, R. P.; NISLOW, C.; FUCHS, J. R.; MILLER, S. A.; RAJASHEKARA, G. Discovery of novel small molecule modulators of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Frontiers in Microbiology**, v.6,

p.1-10, 2015. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26539169/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2015.01127.

YAMAMOTO, S.; SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y.; MOCHIZUKI, M.; SUZUKI, S. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. **Pest Management Science**, v.71, n.5, p.722-727, 2015. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24889125/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1002/ps.3837.

YENDYO, S.; RAMESH, G. C.; PANDEY, B, R. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. **F1000Research**, v.6, p.1-10, 2017. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29560253/>>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.12688/f1000research.12448.3.

ZAVATTI, L. M. S.; ABAKERLI, R. B. Resíduos de agrotóxicos em frutos de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.3, p.473-480, 1999. Available from: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X1999000300020>. Accessed: JUN. 6, 2020. doi: 10.1590/s0100-204x1999000300020.

6.2 CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

Título: Antagonismo de diferentes espécies de *Lactobacillus* frente a fitobactérias

Autores: Rodolfo Sodré Tavares^{1*}, Ludmila Batista Machado², Abadia dos Reis Nascimento³, Lilian Carla Carneiro⁴, José Daniel Gonçalves Vieira¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, GO, Brasil.

*e-mail: free_flying_@hotmail.com

e-mail: jvieira@ufg.br

²Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Setor Leste Universitário, Área 4, Cep 74605-010, GO, Brasil.

e-mail: milabatistam@gmail.com

³Horta do setor de horticultura. Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia, Cep 74690-900, GO, Brasil.

e-mail: abadiadosreis@ufg.br

⁴Laboratório de Microbiologia de Microrganismos. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Cep 74605-050, GO, Brasil.

e-mail: liliancarla@ufg.br

Submetido à revista: Pesquisa Agropecuária Tropical

Data da submissão do manuscrito: 02/08/2021

Status atual: submetido

ANTAGONISMO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS* FRENTE A FITOBACTÉRIAS

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes e mais cultivadas do mundo, possuindo um mercado de produtos derivados com alto apelo comercial. A inoculação de bactérias probióticas pode atuar na prevenção de doenças como, mancha bacteriana, murcha bacteriana, podridão mole, entre outras, além de diminuir a utilização de pesticidas e antibióticos, ajudando a mitigar o impacto à saúde humana e ambiental. Parte das amostras utilizadas para o isolamento de BAL foram coletadas a partir de folhas de tomates sadios na Escola de Agronomia (EA) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e outra parte foi obtida de cultura starter a partir do mercado local. Dois métodos de antagonismo foram utilizados, o teste de difusão em meio líquido e o teste em meio sólido. Das 13 cepas testadas neste estudo, 10 apresentaram atividade contra diferentes fitobactérias, o teste de atividade antagônica em meio líquido mostrou-se melhor em comparação ao meio sólido, também foi encontrada ação antimicrobiana de amplo espectro e um halo de inibição de até 22 mm de diâmetro proveniente de uma cepa obtida a partir de cultura starter. Desta forma este trabalho demonstra a atividade antimicrobiana de cepas de BAL testadas *in vitro* contra diferentes fitobactérias.

Palavras-chave: Bioprospecção, Controle biológico, *Lactobacillus* spp., *Solanum lycopersicum*, *Xanthomonas* spp.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes e mais cultivadas do mundo, possuindo um mercado de produtos derivados com alto apelo comercial tanto para produtos industrializados como sopas, molhos, purês e *ketchup*, quanto uma ampla gama de cultivares destinados ao consumo *in natura*, fazendo parte do cotidiano alimentar de grande parte da população mundial (WANG et al., 2018). Sendo ainda de grande importância nutricional devido a presença de diversos compostos benéficos à saúde como, ácido ascórbico (Vitamina C), flavonóides, carotenóides (β -carotenos), ácido fólico, carboidratos, fibra alimentar e licopeno (KHANNA et al., 2019).

A comercialização do tomate e seus derivados exerce significativo impacto na balança comercial de diversos países (FAO, 2021). Por ser vulnerável a diversos fatores bióticos e abióticos tais como ataque de parasitas, plantas daninhas, elevada umidade e temperatura o que favorece o ataque de diversas fitobactérias (SILVA et al., 2006), como patovares de *Xanthomonas* spp., *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum* e *Pseudomonas corrugata*, cursando com o aparecimento da mancha bacteriana, infecção de sementes e podridão mole, respectivamente (ZALUGA et al., 2013; TEPER et al., 2018).

Neste sentido, devido ao aumento vertiginoso da população mundial e consequentemente uma crescente demanda por diversos alimentos, entre eles o tomate e seus derivados, a utilização de pesticidas e antibióticos estão entre as principais estratégias de combate às suas doenças, inclusive aquelas causadas por fitobactérias (WANG et al., 2018). Contudo, vale destacar que a utilização de pesticidas banidos do mercado e com alto grau de toxicidade para os seres humanos e meio ambiente, ainda estão sendo comercializados em muitos países, bem como a utilização de antibióticos em larga escala induzindo o desenvolvimento de isolados bacterianos resistentes fazendo com que a utilização de probióticos como forma de controle biológico venha a tornar-se uma boa alternativa (ITAKO et al., 2015).

Desta forma os objetivos deste trabalho foram isolar e testar cepas de bactérias ácido-láticas (BAL) frente a diferentes fitobactérias aplicando a metodologia de teste de difusão em meio líquido e sólido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os microrganismos utilizados nesta pesquisa fazem parte da bacterioteca pertencente ao LAMAB, estando preservados em glicerol a 20% (m/v) a temperatura de -20 °C.

2.2 Isolamento de bactérias ácido-láticas (BAL) presentes em tomateiros sadios da escola de agronomia da UFG

Para isolar as BAL foi utilizado agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e caldo MRS com ajuste de pH para $6,5 \pm 0,2$, este meio foi escolhido por ter uma considerável aceitação como sendo um meio de uso global para isolamento destes microrganismos em particular devido a sua alta eficiência e capacidade de sustentar uma vasta gama de BAL. Para o meio sólido foram utilizados 17g de Agar para cada 1 litro de água (CARR et al., 2002).

Amostras de folhas de tomateiros sadios foram coletadas da EA da UFG e acondicionadas em sacos plásticos estéreis e levadas ao LAMAB. No laboratório os vegetais foram introduzidos em Erlenmeyers de 300 mL contendo uma solução salina (NaCl 0,85% m/v) e incubados a 135 rpm/30 °C em um “*shaker*” por duas horas. Após este tempo alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e diluídas até 10^{-6} em tubos de rosca contendo 9,0 mL de uma nova solução salina (NaCl 0,85% m/v). 100 µL das diluições foram retiradas e inoculadas placas de Petri contendo Agar MRS e tubos de rosca contendo caldo MRS e incubadas a 37 °C até o desenvolvimento de colônias nas placas e turvação nos tubos. As colônias foram retiradas com o auxílio de palito de dente autoclavado e inoculado em placas de Petri contendo Agar MRS e incubadas como descrito anteriormente.

O material crescido nos tubos foi inoculado em placas de Petri contendo Agar MRS e incubadas como descrito anteriormente. As colônias

crescidas foram isoladas e replicadas como descrito. As bactérias crescidas nas placas pelos dois processos foram purificadas repetindo o procedimento anterior por 3 x até a obtenção de uma cultura visualmente axênica.

Os isolados foram mantidos em glicerol a 20% (m/v) em tubos tipo Eppendorfs de 2,0 mL em freezer a -20 °C (COSTA et al., 2009) até o momento da utilização.

2.3 Isolamento de BAL a partir de cultura starter

Para o isolamento de BAL foi utilizado uma cultura de BAL obtida em farmácia de manipulação do comércio local. No laboratório apenas uma porção do conteúdo total das cápsulas foram introduzidos em Erlenmeyer de 50 mL contendo solução salina (NaCl 0,85% m/v) autoclavada, depois incubado a 150 rpm/37 °C em um “*shaker*” por 2 horas. Logo após este tempo, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e diluídas até 10^{-8} em tubos de rosca contendo 9,0 mL de uma nova solução salina (NaCl 0,85% m/v). Um total de 100 µL das diluições foram retiradas e inoculadas em placas de Petri contendo Agar MRS e tubos de rosca contendo caldo MRS e incubadas a 37 °C até o desenvolvimento de colônias nas placas e turvação nos tubos. As colônias foram retiradas com o auxílio de palito de dente autoclavado e inoculado em placas de Petri contendo Agar MRS e incubadas como descrito anteriormente. As bactérias crescidas pelos dois métodos foram purificadas repetindo o procedimento anterior por 3 x até a obtenção de uma cultura visualmente axênica. A forma de armazenamento ocorreu como descrita na etapa anterior.

2.4 Isolamento de *Xanthomonas* spp. presente em tomateiros doentes

Para isolar as bactérias do gênero *Xanthomonas* spp. foi utilizado o meio semi-seletivo NYDAM (NYDA+ampicilina) com a seguinte composição; (extrato de carne 3g, peptona 5g, glicose 10g, extrato de levedura 5g, ágar 18g, ampicilina 100mg L⁻¹ de água destilada). O isolamento de diferentes patovares de *Xanthomonas* spp. pode ocorrer a partir de vários tecidos vegetais infectados, sobretudo sem a interferência de saprófitas, desta maneira auxiliando na identificação do microrganismo. O crescimento

observável ocorre após 24/48 horas apresentando colônias pequenas e amareladas, desta forma sendo de grande utilidade para o isolamento e crescimento de *Xanthomonas* spp. pois, segundo Peixoto (2006) alguns meios semi-seletivos podem ser sensíveis à técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas imunológicas, com a vantagem de serem mais fáceis de serem identificados e menos dispendiosos. Amostras de tomateiros doentes foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e levadas ao LAMAB.

No laboratório as folhas foram separadas em porções, com ajuda de uma lâmina de bisturi descartável (MAXICOR), sendo introduzidas em Erlenmeyer de 250 mL, contendo solução salina (NaCl 0,85% m/v) e incubada a 130 rpm/29 °C em um “shaker” por duas horas. Após este tempo, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas e diluídas até 10^{-6} em tubos de rosca contendo 9,0 mL de uma nova solução salina (NaCl 0,85% m/v). Uma quantidade de 100 µL das diluições foram retiradas e inoculadas em placas de Petri contendo o meio NYDAM e incubado a 29 °C até o desenvolvimento das colônias.

Depois de crescidas, as colônias foram retiradas com o auxílio de palito de dente autoclavado e inoculado em placas de Petri contendo o meio NYDAM e incubadas como descrito anteriormente. As colônias crescidas foram isoladas e replicadas como descrito. As bactérias crescidas foram purificadas repetindo o procedimento anterior por 3 x até a obtenção de uma cultura visualmente axênica.

Os isolados foram mantidos em glicerol a 20% (m/v) em tubos tipo Eppendorfs de 2,0 mL em freezer a -20 °C (Costa et al., 2009) até o momento da utilização.

2.5 Caracterização preliminar das cepas BAL

Na observação macroscópica notou-se colônias brancas, opacas e bordas bem definidas, com rápido crescimento em meio MRS durante 24/h. Durante a microscopia foram observados microrganismos com morfologia baciliformes, gram-positivos e não formadores de esporos. Negativo para o teste da Catalase feito em lâmina de microscopia previamente

descontaminada com álcool 70%. Apresentando crescimento com temperatura ótima de crescimento oscilando entre 30 a 37 °C.

2.6 Teste de Identificação Morfotintorial

Foi preparado um esfregaço de cultura axênica, para isto foi utilizado uma lâmina limpa e desengordurada, aplicando a técnica da coloração de Gram. O preparo do esfregaço ocorreu na capela de fluxo laminar, desta maneira minimizando possíveis interferências do ambiente, protegendo as amostras manipuladas no seu interior (MODESTO et al., 2016). Primeiro foi inoculado uma alíquota de 10 µL de salina (NaCl 0,85% m/v) autoclavada no centro da lâmina, depois foi capturada uma colônia isolada proveniente do meio MRS e com a ajuda de um palito de dente autoclavado, o material foi combinado de maneira a formar um esfregaço uniforme.

Após este procedimento, o material foi fixado pelo calor, passando rapidamente a parte inferior da lâmina pelo bico de bunsen por 3 x. Na sequência foi utilizado o conjunto para coloração de Gram. A lâmina foi coberta pelo corante Violeta de Genciana (GRAM) de forma a cobrir todo o esfregaço, mantendo-o por 1 minuto. Depois foi realizada a lavagem da lâmina com água destilada. O próximo passo consistiu em cobrir o esfregaço com Lugol Fraco (GRAM) preservando por mais 1 minuto, depois a lâmina foi lavada novamente com água destilada, então descorada com a Solução Descorante (GRAM), Na próxima etapa depois de repetir o processo de lavagem como descrito acima, foi adicionado o último corante, a Fucsina Fenicada (Gram) aguardando por 30 segundos, o processo de lavagem foi repetido e a lâmina foi seca à temperatura ambiente. O esfregaço foi levado ao microscópio onde, primeiro foi observado em objetiva de 10x para examinar a coloração então, em imersão utilizando óleo mineral em objetiva de 100x.

2.7 Teste de atividade antagônica em meio líquido

Para este teste, as cepas de BAL foram crescidas em tubos contendo 5 mL de caldo MRS a 37 °C *overnight*, após este tempo a cultura foi centrifugada a 5000 g por 15 minutos a 4 °C. Uma porção de 2 mL do

sobrenadante foi transferido para tubos tipo Eppendorfs previamente autoclavados e identificados, o procedimento foi repetido para todas as bactérias como descrito anteriormente. As cepas indicadoras foram padronizadas para a turbidez do tubo N° 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$) em seguida inoculadas em placa de Petri contendo agar Müller-Hinton. As cepas indicadoras utilizadas foram *Xanthomonas* spp. patogênica para a pimenta (X-PIM), *Xanthomonas* spp. patogênica para a Cana-de-açúcar (XTC), duas cepas de *Xanthomonas* spp. isoladas da EA da UFG (XT1-TX2), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CMM), *Pectobacterium carotovorum* (PC) e *Pseudomonas corrugata* (PCOR).

Após este procedimento, poços de 5,0mm de diâmetro foram feitos com a ajuda de uma ferramenta previamente autoclavada, foram inoculados 100 µL do sobrenadante e incubados por 24 horas a 37 °C. Como controle negativo foi utilizado uma alíquota de 100 µL de caldo MRS isento de crescimento. Após este tempo o halo de inibição foi determinado pela medição dos halos como descrito por (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017), com modificações.

2.8 Teste de atividade antagônica em meio sólido - técnica dos “plugs”

As BAL previamente isoladas, foram cultivadas em agar MRS por 2 dias a 37 °C até a obtenção de crescimento confluyente. Logo após este período, foi adicionado 1 mL de clorofórmio sobre a tampa interna da placa de Petri vertida, após 10 minutos e a evaporação completa do clorofórmio, cilindros de aproximadamente 7,0 mm de diâmetro (plugs) foram cortados com a ajuda de um instrumento especial previamente autoclavado, em seguida foram inoculados sobre uma placa de petri contendo agar Müller-Hinton inoculado previamente com as fitobactérias, padronizadas para a turbidez do tubo N° 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$).

O procedimento foi repetido para todas as bactérias como descrito anteriormente. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após este tempo o halo de inibição foi determinado pela medição dos halos (BIAGI; AZEVEDO, 1992). Como controle negativo foi utilizado um plug de agar MRS isento de crescimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de probióticos, em especial BAL, como forma de controle biológico contra fitopatógenos vem ganhando cada vez mais espaço devido ao seu potencial (FORHAD et al., 2015). Algumas cepas são consideradas seguras, tanto pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos da América, quanto pela *European Food Safety Authority* (EFSA) na Europa (FANG et al., 2020). Probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em certas quantidades podem promover benefícios ao hospedeiro (MOHAMED et al., 2016). Entre os probióticos as bactérias BAL são largamente utilizadas, nos mais diversos campos, como na medicina humana, veterinária, preservação de alimentos, melhoramento de plantas e prevenção de doenças como forma de controle biológico (LIMANSKA et al., 2015).

Neste estudo observou-se que a maioria dos *Lactobacillus* spp. apresentaram algum grau de atividade contra as cepas de fitobactérias testadas (Tabela 1), apenas o fitopatógeno XT2 isolado da EA da UFG, foi resistente a todos os *Lactobacillus* spp.

Tabela 1 – Atividade antagônica de diferentes espécies de *Lactobacillus* spp. crescidos em caldo e agar MRS frente a diferentes isolados de bactérias fitopatogênicas.

halo de inibição (Ø mm)*												
Bactérias indicadoras <i>Lactobacillus</i>	CMM ²		PC ²		PCOR ²		XTC ²		X-PIM ²		XT1 ³	
	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido
<i>L. Breve</i> ¹	-	9	20	16	9	7	12	9	11	9	11	15
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ¹	-	-	-	-	-	-	15	10	-	-	-	7
<i>L. delbrueckii</i> ¹	9	7	20	16	9	7	11	9	8	7	-	14
<i>L. gasser</i> ¹	-	-	21	15	7	7	14	8	9	9	-	14
<i>L. helveticus</i> ¹	10	9	-	-	14	9	14	9	15	8	-	-
<i>L. johnsonii</i> ¹	10	8	21	18	10	9	12	8	10	7	18	16
<i>L. plantarum</i> ¹	9	7	21	15	10	9	11	9	9	7	-	14
<i>L. rhamnosus</i> ¹	7	7	8	7	9	8	15	11	8	-	-	16
<i>L. sporogenes</i> ¹	8	7	22	16	8	7	9	7	7	-	16	11
<i>S. thermophilus</i> ¹	-	-	-	-	-	-	11	7	-	-	-	7

1 Microrganismos probióticos pertencentes ao LAMAB. 2. Bactérias fitopatogênicas pertencentes ao LAMAB - CMM. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. PC. *Pectobacterium carotovorum*. PCOR. *Pseudomonas corrugata*. XTC. *Xanthomonas* de cana. X-PIM. *Xanthomonas* de pimenta. 3. Microrganismo isolado da EA da UFG - XT1. *Xanthomonas* tomate1. * Média de 3 repetições.

Dos 13 BAL analisados neste estudo (12 *Lactobacillus* e 1 *Streptococcus thermophilus*) apresentaram potencial em inibir quase todos os fitopatógenos testados, incluindo um microrganismo gram-positivo, sugerindo que o espectro de ação não é restrito a microrganismos gram-negativos. Estes resultados sugerem a produção de moléculas com capacidade antimicrobiana, seja de novas substâncias ou aquelas já mencionadas na literatura (RODRIGUES, 2009).

A produção de substâncias com potencial inibitório por parte das BAL, podem ser explicadas em parte por produtos do metabolismo como os ácidos orgânicos, que são um dos componentes resultantes do processo de fermentação destas bactérias, estes ácidos atuam na redução do pH, portanto acidificando o meio, onde, o ácido láctico e ácido acético, também podem agir diretamente como substância antagônica frente a outros microrganismos, interagindo de forma direta, acidificando o meio intracelular e causando a apoptose, além do mais a formação de peróxido de hidrogênio também pode estar envolvida no antagonismo (GÄNZLE et al., 2000).

Uma outra classe de moléculas que pode ajudar a explicar este efeito, são as bacteriocinas, estes complexos proteicos sintetizados nos ribossomos, apresentam como característica serem termoestáveis e também resistentes à proteases, geralmente são pequenas moléculas que variam entre 6 a 8 kilodaltons (kDa) de peso molecular. Existe ainda um intrincado sistema de formação e secreção desta molécula, que depende da ativação de genes e outros complexos proteicos que permitam a secreção da bacteriocina sem que a célula bacteriana produtora seja alvo de sua ação pois, estes compostos antimicrobianos atuam na membrana celular da célula alvo, induzindo a apoptose por lise osmótica (PANDEY et al., 2013).

Dos isolados apresentados neste estudo, a cepa *Lactobacillus sporogenes* apresentou o maior halo de inibição, seguida por *L. breve*, *L. delbrueckii*, *L. gasserii*, *L. johnsonii* e *L. plantarum*. A maior atividade antagônica foi contra uma cepa de *P. carotovorum*, no teste de antagonismo em meio líquido, também foi obtida atividade contra um patovar de *Xanthomonas* spp. isolada da EA da UFG (XT1), sugerindo a presença de uma biomolécula com promissora atividade antimicrobiana (Figura 1).

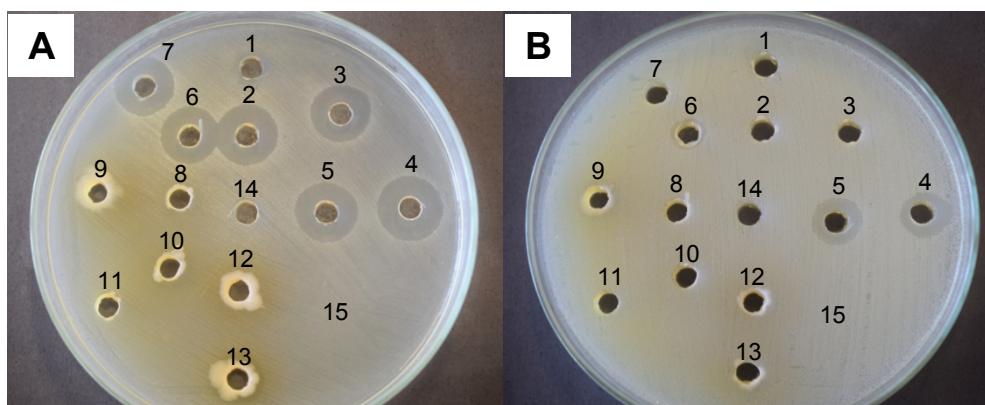


Figura 1. Teste de atividade antagonônica em meio líquido. (1) *L. rhamnosus*. (2) *L. delbrueckii*. (3) *L. plantarum*. (4) *L. sporogenes*. (5) *L. johnsonii*. (6) *L. breve*. (7) *L. gasseri*. (8) FT1. (9) *L. helveticus*. (10) ST1. (11) FT2. (12) *L. bulgaricus*. subsp. *delbrueckii*. (13) *S. thermophilus*. (14) controle. (15) bactéria indicadora. (A) *P. carotovorum*. (B) *Xanthomonas* spp. tomate1.

Estes dados estão de acordo com os de Limanska et al., (2015) e Daranas et al., (2018), onde é relatado a utilização de cepas de BAL como forma de controle biológico frente a diferentes tipos de fitobactérias, incluindo patovares de *Xanthomonas*. Várias espécies de *Xanthomonas* spp. são consideradas patogênicas para diversas culturas, entre elas, a uva, romã, manga, pimenta, cana-de-açúcar, tomate, dentre outras (Midha & Patil, 2014), neste sentido a triagem por cepas que expressam atividade contra estas fitobactérias é de grande interesse.

No teste de difusão pela técnica dos “plugs” houve um halo de inibição menor em comparação com a técnica utilizando o caldo MRS, como pode ser observado na (Figura 2).

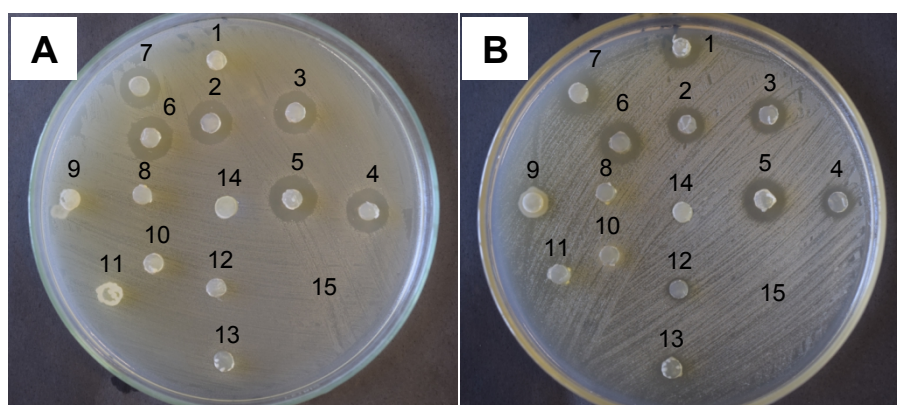


Figura 2. Teste de atividade antagonônica em meio sólido “plugs”. (1) *L. rhamnosus*. (2) *L. delbrueckii*. (3) *L. plantarum*. (4) *L. sporogenes*. (5) *L. johnsonii*. (6) *L. breve*. (7) *L. gasseri*. (8) FT1. (9) *L. helveticus*. (10) ST1. (11) FT2. (12) *L. bulgaricus*. subsp. *delbrueckii*. (13) *S. thermophilus*. (14) controle. (15) bactéria indicadora. (A) *P. carotovorum*. (B) *Xanthomonas* spp. tomate1.

Como resultado, o método de difusão em meio líquido mostrou-se melhor em comparação com o meio sólido “plugs”, isto pode ser explicado devido a soma do conjunto de todos os metabólitos presentes no meio atuando de forma sinérgica como; ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocina. Por outro lado no meio sólido, um tempo maior de incubação em relação ao meio líquido pode ter potencializado as condições para o crescimento e da atividade de outras cepas, embora com a formação de um halo de inibição menor, sugerindo a atividade apenas da bacteriocina (BIAGI; AZEVEDO, 1992; ÇADIRCI; ÇITAK, 2005).

As cepas de LAB isoladas da EA da UFG não apresentaram atividade contra os microrganismos testados neste estudo. O único microrganismo resistente a todos os isolados neste trabalho foi XT2, indicando uma possível resistência às cepas de LAB triadas por nós. Entretanto, é necessário destacar que os experimentos *in vitro* podem não retratar as condições naturais em sua totalidade, isto pode ajudar a explicar os padrões de atividade divergentes entre o meio líquido, sólido ou, em certos casos, sua ausência (RODRIGUES, 2009).

4. CONCLUSÃO

A cultura starter obtida a partir do comércio local, demonstra o melhor conjunto de atividades, de um total de 13 cepas testadas neste estudo, 10 apresentam ação contra diferentes fitobactérias, entre estas, sete expressaram as melhores atividades antimicrobianas com um halo de inibição de até 22 mm de diâmetro e, dentre este último grupo, *L. johnsonii*, *L. breve* e *L. plantarum* apresentam o maior número de atividades respectivamente, tendo sido encontrado apenas uma cepa resistente a todos os LAB testados.

Neste estudo, o teste de atividade antagônica em meio líquido mostra-se melhor em comparação ao meio sólido. Foi encontrada ação antimicrobiana de amplo espectro, tanto fitopatógenos gram-positivos quanto gram-negativos foram inibidos. As cepas de BAL apresentadas neste estudo mostram-se promissoras, com grande potencial de controle biológico e com possível implementação na prática de controle de doenças do tomateiro,

podendo ainda, ajudar a mitigar o impacto causado por resíduos de pesticidas e antibióticos na alimentação e no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

BIAGI, C.M.R.; AZEVEDO, J.L. Detecção de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. *Scientia Agricola*, v. 49, p. 1-8, 1992.

ÇADIRCI, B.H.; ÇITAK, S. A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 4, n. 4, p. 237-241, 2005.

CARR, J.F.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

COSTA, C.E.; TEIXEIRA, S.F.M.; DANTAS, M.V.T.; MELO, P.S.V.; ARAÚJO, C.A.S.; ROLIM, N.B. Microbiological samples storage and preservation principles, *Ciência Animal*, v. 19, n. 2 p. 111-112, 2009.

DARANAS, N.; BADOSA, E.; FRANCÉS, J.; MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. Enhancing water stress tolerance improves fitness in biological control strains of *Lactobacillus plantarum* in plant environments. *PLoS ONE*, v. 13, n. 1, p. 1-21, 2018.

FANG, X.; DUAN, Q.; WANG, Z.; LI, F.; DU, J.; KE, W.; LIU, D.; BEIER, R.C.; GUO, X.; ZHANG, Y. Products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Strain F17 and *Leuconostoc lactis* Strain H52 Are Biopreservatives for Improving Postharvest Quality of ‘Red Globe’ Grapes, *Microorganisms*, v. 8, n. 5, p. 1-16, 2020.

FAO- *FAOSTAT* - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso: Junho de 2021.

FORHAD, M.H.; RAHMAN, S.M.K.; RAHMAN, S.; SAIKOT, F.K.; BISWAS, K.C. Probiotic Properties Analysis of Isolated Lactic Acid Bacteria from Buffalo Milk, *Archives of Clinical Microbiology*, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2015.

GÄNZLE, M.G.; HÖLTZELE, A.; WALTER, J.; JUNG, G.; HAMMES, W.P. Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 10, p. 4325-4333, 2000.

GORDON, S. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, v. 38, n. 12, p. 3257-3264, 2008.

IBGE- *Sistema Brasileiro de Geografia e Estatística – SIDRA*, 2021; Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acesso: Junho de 2021.

ITAKO, A. T.; JÚNIOR, J. B. T.; JÚNIOR, T. A. F. S.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Chemical products induce resistance to *Xanthomonas perforans* in tomato. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n.3, p. 701-706, 2015.

KHANNA, K.; SHARMA, A.; OHRI, P.; BHARDWAJ, R.; ALLAH, E. F. A.; HASHEM, A.; AHMAD, P. Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* mill. Resistance to plant parasitic nematodes: A metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules*, v. 9, n, 11, p. 4-30, 2019.

LIMANSKA, N.; KOROTAEVA, N.; BISCOLA, V.; IVANYSTSIYA, T.; MERLICH, A.; FRANCO, B. D. G. M.; CHOBERT, J. M.; IVANYTSIA, V.; HAERTLÉ, T. Study of the Potential Application of Lactic Acid Bacteria in the Control of Infection Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, v. 06, n. 08, p. 1-13, 2015.

MIDHA, S.; PATIL, P.B. Genomic Insights into the Evolutionary Origin of *Xanthomonas axonopodispv. citri* and Its Ecological Relatives. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 20, p. 6266-6279, 2014.

MODESTO, G.L.A.; TEIXEIRA, S.A.; SILVEIRA, S.R.M.; ALMEIDA, T.M.M. Normas e Procedimentos de Segurança e Boas Práticas dos Laboratórios da Embrapa Agroindústria Tropical, *Embrapa Agroindústria Tropical*, p. 1-55, 2016.

MOHAMED, A. H.; OSMAN, G. Y.; ZOWAIL, M. E. M.; ESAWY, H. M. I. E. Effect of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on certain parasitological and molecular aspects in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 40, n. 3, p. 823-832, 2016.

PANDEY, N.; MALIK, R.K.; KAUSHIK, J.K.; SINGROHA, G. Gassericin A: a circular bacteriocin produced by Lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 11, p. 1977-1987, 2013.

PEIXOTO.; R.A.; MARIANO, R.L.R.; VIANA, O.I. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola*, *Ciência Rural*, v. 36, p. 1317-1320, 2006.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, K.R. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances, *Biomedical Journal*, vol 40, p. 270-283, 2017.

RODRIGUES, A.A. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats. 2009. 80f. Dissertação (área de concentração de microbiologia) - *Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás*, 2009.

SILVA.; A.G.D.; ROCHA, C.M.; CARVALHO, O.A.; FERNANDES, A.C.M.; CARMO, F.G.M. Efeito de produtos químicos e biológicos sobre a mancha bacteriana,

flora microbiana no filoplano e produtividade de pimentão. *Horticultura Brasileira*, vol 24, p. 1-7, 2006.

TEPER, D.; GIRIJA, A.M.; BOSIS, E.; POPOV, G.; SAVIDOR, A.; SESSA, G. The *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopAU is a nactive protein kinase that manipulates plant MAP kinase signaling. *PLoS pathogens*, v. 14, p. 1-33, 2018.

WANG, Y.; SUN, P.; LI, H.; ADHIKARI, B, P.; LI, D. Rheological Behavior of Tomato Fiber Suspensions Produced by High Shear and High Pressure Homogenization and Their Application in Tomato Products. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2018, p. 1-12, 2018.

ZALUGA, J.; STRAGIER, P.; VAERENBERGH, V.J.; MAES, M.; DE VOS, P. Multilocus variable-number-tandem-repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC microbiology*, v. 13, p. 1-15, 2013.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de BAL como forma de controle biológico, corrobora os dados já conhecidos pela ciência, demonstrando a promissora aplicação destes microrganismos contra fitobactérias de várias espécies animais e vegetais, sobretudo do tomate. O presente trabalho demonstra que, os microrganismos isolados a partir de cultura starter, obtidas do mercado local, apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro frente a cepas de fitobactérias testadas por meio da técnica de antagonismo em meio líquido e sólido. Por conseguinte é sempre desejável a triagem por cepas de BAL que apresentem atividade contra fitobactérias, tendo em vista que, em muitos casos o sucesso do controle biológico é espécie específico.

A atividade antimicrobiana de BAL, revelou ser de grande importância pois, a utilização exacerbada de pesticidas químicos incluindo formulações banidas em diversos países, continuam a ser utilizadas por agricultores ao redor do mundo, outro problema é a aplicação desenfreada de antibióticos, onde, o mal uso destas estratégias trazem como principais consequências, a poluição ambiental, humana e animal, este último cursando com a seleção de isolados microbianos resistentes.

Portanto, tendo em vista a importância do valor agregado a cultura do tomate no Brasil e no mundo e embora os testes realizados in vitro tenham sido promissores, faz-se necessário testes em campo pois as cepas de *Lactobacillus* spp., triadas neste estudo, demonstram promissora atividade com potencial biotecnológico contra fitobactérias do tomate.

8. APÊNDICE

8.1 Construção da matriz com o perfil de crescimento de patovares do gênero *Xanthomonas* spp. para identificação utilizando de testes bioquímicos no software Identax

Testes de biologia molecular como por exemplo o teste da PCR são utilizados para amplificar um fragmento de uma cópia de DNA gerando milhões ou milhares de cópias de uma sequência específica de DNA (ZHONG et al., 2016). Podendo auxiliar no esclarecimento de diversas patologias humanas, veterinárias e ambientais. Contudo os testes de identificação molecular ainda são caros e dispendiosos, desta forma o uso de técnicas moleculares para análises de rotina ou como forma de diagnóstico rápido para análises que estejam envolvidas em um elevado número de amostras ainda é um entrave, sendo limitada aos laboratórios de diagnóstico molecular, além dos custos em adquirir os equipamentos e insumos é necessário investir em mão-de-obra qualificada para garantir uma interpretação segura dos dados obtidos, inclusive para poder analisar os possíveis fatores que levam a resultados falso-negativos ou falso-positivos.

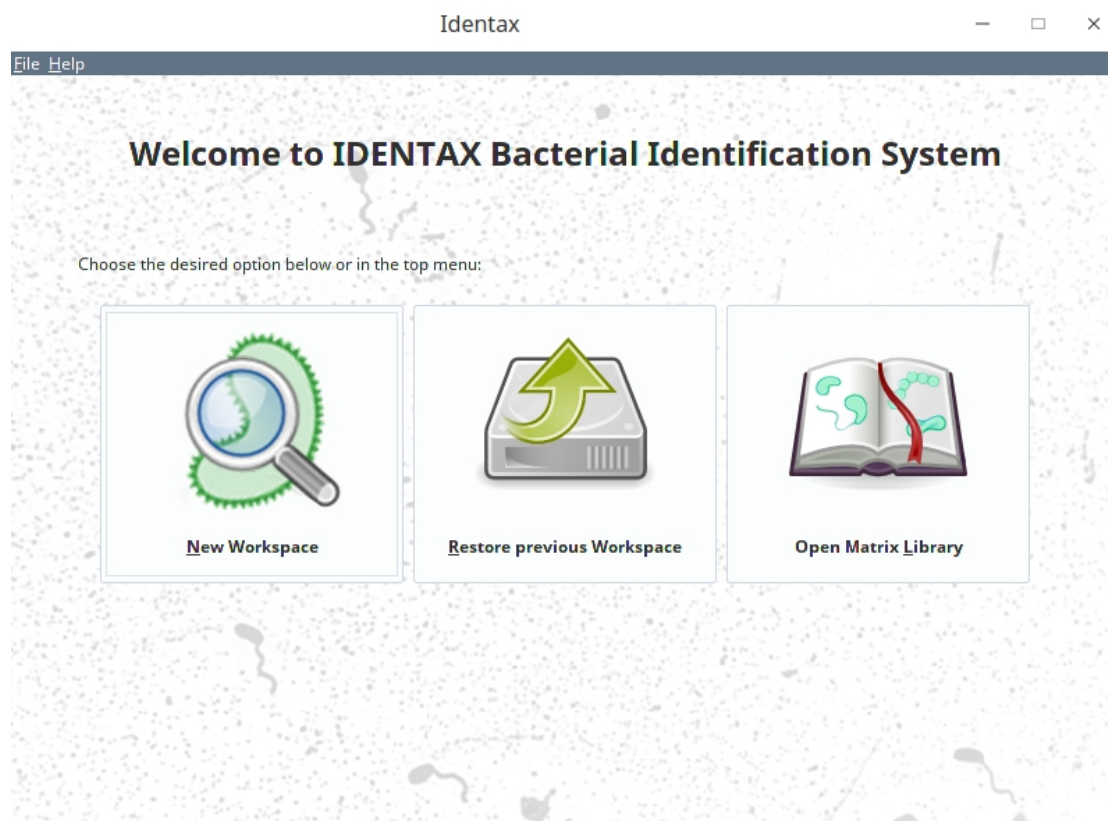
Por esta razão a utilização de testes bioquímicos baseados em kits comerciais ainda são úteis tendo em vista que alguns são projetados de maneira a indicar a atividade metabólica de bactérias gram-negativas podendo identificar patógenos ambientais e de interesse clínico, com base em um padrão característico ou “fingerprint” metabólico.

Neste sentido foi desenvolvida uma matriz (Figura 1) com informações do perfil de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio a partir dos dados obtidos por Vauterin et al. (1995) utilizando o software WPS office para Linux (Kingsoft corp. ©), sendo compatível com outras plataformas e planilhas eletrônicas como, Excel para Windows e Mac (Microsoft corp. ©) e Libreoffice (Document Foundation). As matrizes são exportadas e analisadas no software Identax como proposto por Flores et al. (2009) (Figura 2), o Identax é um software *open source* (código aberto) que permite a modificação do seu código fonte podendo ser adaptado às mais diversas necessidades seja clínica ou ambiental, possibilitando a identificação de microrganismos a partir de uma matriz dicotômica de forma amigável e interativa (Figura 3), com a possibilidade de pesquisas sem uma conexão com a internet.

Figura 1: Exemplo de uma matriz pronta para ser importada para o software Identax

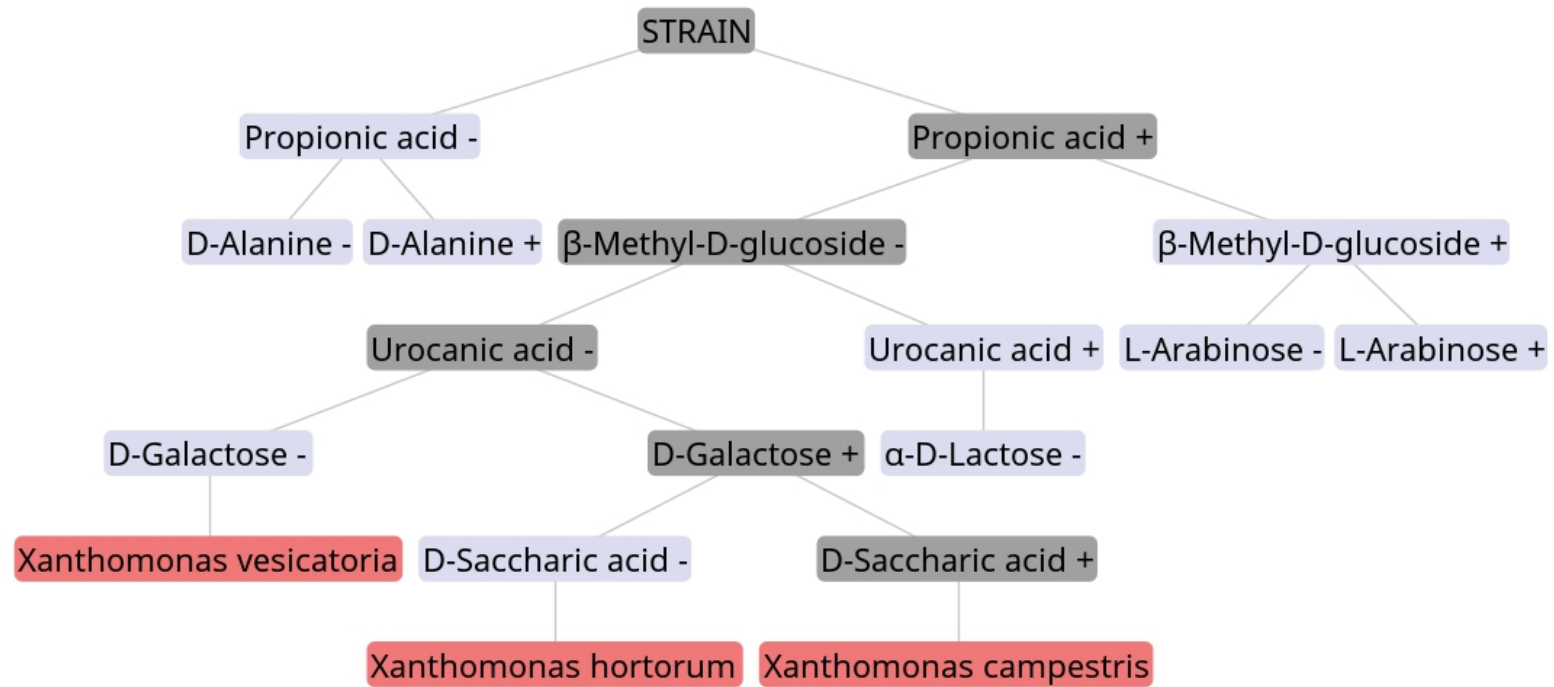
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	Xanthomonas International	α -Cyclode	Dextrin	Glycogen	Tween 40	Tween 80	N-Acetyl- β -D	N-Acetyl-D	Adonitol	L-Arabinos	D-Arabitol	Cellobiose	meso-Eryt	D-Fructos	L-Fucose	D-Galacto	Gentiot
2	<i>Xanthomonas fragariae</i>	0	100	100	0	0	0	50	0	0	0	0	0	100	50	50	1
3	<i>Xanthomonas hortorum</i>	3	83	38	21	66	0	69	0	7	3	97	0	100	86	72	1
4	<i>Xanthomonas populi</i>	0	100	100	0	0	0	50	0	0	0	0	0	100	0	50	
5	<i>Xanthomonas arboricola</i>	0	100	92	75	92	0	100	0	8	0	100	0	100	92	100	
6	<i>Xanthomonas cassavae</i>	0	80	80	80	80	20	80	0	40	0	80	0	100	100	60	1
7	<i>Xanthomonas codiae</i>	0	100	100	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	0	100	1
8	<i>Xanthomonas bromi</i>	0	100	50	50	50	0	100	50	50	50	100	0	100	50	100	1
9	<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	0	100	100	60	80	0	20	0	0	0	100	0	100	60	40	
10	<i>Xanthomonas axonopodi</i>	8	90	82	68	77	12	69	5	15	6	93	0	98	84	87	
11	<i>Xanthomonas oryzae</i>	0	100	70	30	40	0	40	0	20	0	90	0	100	30	40	
12	<i>Xanthomonas vasicola</i>	0	89	78	22	44	0	33	0	0	0	89	0	100	78	56	
13	<i>Xanthomonas pisi</i>	0	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	0	100	100	100	1
14	<i>Xanthomonas melonis</i>	0	100	100	100	100	0	100	0	0	0	100	0	100	100	100	1
15	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	0	100	57	71	100	14	86	0	0	0	86	0	100	100	0	1
16	<i>Xanthomonas campestris</i>	0	100	89	84	79	0	95	0	0	0	100	0	100	89	95	1
17	<i>Xanthomonas translucens</i>	3	94	78	38	50	3	78	0	41	0	78	0	100	31	47	
18	<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	20	100	100	20	20	0	80	0	20	0	100	0	100	0	100	1
19	<i>Xanthomonas theicola</i>	67	100	100	100	100	0	0	33	67	0	100	0	100	100	100	1
20	<i>Xanthomonas sacchari</i>	0	100	100	100	100	0	100	0	100	50	100	0	100	100	100	1
21	<i>Xanthomonas albilineans</i>	0	0	0	20	0	0	100	0	20	0	60	0	100	80	0	
22																	
23																	
24																	
25																	

Disponível em: <http://www.identax.org/> Acesso: junho de 2021. Fonte: O próprio autor

Figura 2: Tela de início do software Identax

Disponível em: <http://www.identax.org/> Acesso: junho de 2021. Fonte: O próprio autor

Figura 3: Exemplo de uma árvore dicotômica produzida no software Identax



Disponível em: <http://www.identax.org/> Acesso: junho de 2021. Fonte: O próprio autor

REFERÊNCIAS

FLORES, O.; BELANCHE, L.A.; BLANCH, A.R. New Multiplatform Computer Program for Numerical Identification of Microorganisms. **Journal of clinical microbiology**, Vol 47, p. 1-3, 2009.

VAUTERING, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International journal of systematic bacteriology**. Vol 45, p. 1-18, 1995.

ZHONG, Y.; HUANG, L.; ZHANG, Z.; XIONG, Y.; SUN, L.; WENG, J. Enhancing the specificity of polymerase chain reaction by graphene oxide through surface modification: zwitterionic polymer is superior to other polymers with different charges. **International journal of nanomedicine**, p. 1-14, 2015.