

Isolamento e Caracterização de Bactérias do Lodo de Esgoto com Potencial Antagonismo a Nematóides

Isolation and Characterization of Bacteria from Sewage Sludge, with Potential Antagonism to Nematodes

Cacilda Márcia Duarte Rios Faria¹
Vicente Paulo Campos²
Ricardo Magela de Souza³
Fátima Maria Souza Moreira⁴
Bianca de Moura⁵
Luciene de Oliveira Ribeiro⁵
Marcos Ventura Faria⁶

Resumo

Foram isoladas e caracterizadas bactérias presentes no lodo de esgoto visando à realização de estudos futuros de interação desses organismos com fitonematóides. Os lodos utilizados são provenientes das estações de tratamento de Franca e Barueri, no Estado de São Paulo. Foram obtidos 77 isolados do lodo de Franca e 143 do de Barueri. Desses isolados de Franca testados, 77% foram Gram-positivos e 23% Gram-negativos. Para os 143 isolados obtidos do lodo de esgoto de Barueri, 61% foram Gram-positivos e o restante Gram-negativo. Os isolados Gram-positivos podem, estar relacionados com espécies do gênero *Bacillus* dos quais várias espécies têm grande importância como agentes de controle de fitopatógenos, inclusive nematóides. Observou-se que 39% e 40% dos microrganismos Gram positivos, isolados dos lodos coletados na ETE de Franca e de Barueri, produziram pigmento fluorescente em meio King B, sendo indicativo de *Pseudomonas fluorescens*. Dos 77 isolados de Franca, 13% apresentaram como característica morfológica bordo lobado, característica de culturas de *Bacillus*. Comparando-os

¹ Eng. Agrônomo, Professor Adjunto - Departamento de Biologia/UNICENTRO;

² Eng. Agrônomo, Professor Titular - Departamento de Fitopatologia/UFLA;

³ Eng. Agrônomo, Professor Adjunto - Departamento de Fitopatologia/UFLA;

⁴ Eng. Agrônomo, Professor Adjunto - Departamento de Ciências do Solo/UFLA;

⁵ Acadêmicas de Agronomia, UFLA;

⁶ Eng. Agrônomo, Professor Adjunto - Departamento de Agronomia/UNICENTRO.

Recebido para publicação em 10/02/2006 e aceito em 30/07/2006

Ambiência	Guarapuava, PR	v.2 n.2	p. 247-256	jul/dez	2006	ISSN 1808 - 0251
-----------	----------------	---------	------------	---------	------	------------------

com os testes bioquímicos, concluiu-se que 80% deles foram Gram-positivos, característica de espécies de *Bacillus*. Dos isolados, 10% apresentaram bordo inteiro, colônia brilhante e arredondada, as quais são características de *Pseudomonas*. Desses, 37% foram Gram-negativos, sendo que 67% desses isolados eram também produtores de pigmento fluorescente em meio King B, características da *P. fluorescens*. Dos 143 isolados de Barueri, 17% apresentaram bordo lobado como característica morfológica, podendo-se suspeitar de serem espécies de *Bacillus* e 5% apresentaram as características de espécies de *Pseudomonas*. Para os isolados do lodo de Barueri, na comparação com os testes bioquímicos constatou-se que 64% dos isolados foram Gram-positivo. Dos isolados com características de *Pseudomonas*, 17% apresentaram-se como Gram-negativas e desses, 17% mostraram-se como produtores de pigmento fluorescente em meio King B, que são características de espécies de *Pseudomonas* do grupo fluorescente.

Palavras-chave: controle biológico; *Pseudomonas*; *Bacillus*.

Summary

This work aimed at isolating and characterizing bacteria presented in sewage sludge with the objective of future studies for the interaction of these organisms with nematodes. For this study, it was used samples of the sewage sludge originated from the treatment stations of the cities of Franca and Barueri, in the state of São Paulo. It was obtained 77 samples of isolated sewage sludge from Franca and 143 from Barueri. From the Franca samples, 77% was Gram-positive and 23% was Gram-negative while from the Barueri samples, 61% was Gram-positive and the rest was Gram-negative. The isolated Gram-positive can be related to the species of the genre *Bacillus*, whose species have great importance as agents of the phytopathogens control, including nematodes. It was observed that 39% and 40% of the Gram-positive microorganisms isolated from the collected sewage sludge in ETE from Franca and from Barueri produced fluorescent pigments in King B medium, as indicative of *Pseudomonas* fluorescent presence. By examining the 77 samples of sewage sludge from Franca, 13% presented as morphologic characteristic, the margin of lobes, characteristic of the *Bacillus* culture. When compared them to the biochemistry tests, it was concluded that 80% was Gram-positive, a characteristic of the *Bacillus* species. By isolating the samples of sewage sludge from Franca, 10% presented whole margin, fluorescent and round colony, characteristics of the *Pseudomonas* while 37% was

Gram-negative, considering that 67% of this isolated sewage sludge produced fluorescent pigments in King B medium, characteristics of *Pseudomonas* fluorescence. By examining the 143 samples of sewage sludge from Barueri, 17% presented the margin of lobes, as a morphologic characteristic, suggesting that they belonged to the *Bacillus* species and 5% presented the characteristic of the *Pseudomonas* species. By isolating the samples of sewage sludge from Barueri, it was found out, during the comparison with the biochemistry tests, that 64% was Gram-positive. From the isolated sewage sludge that presented the *Pseudomonas* characteristics, 17% indicated to be Gram-negative while 17% demonstrated to be producers of fluorescent pigments in King B medium, characteristics of the *Pseudomonas* species from the fluorescent group.

Key words: biological control; *pseudomonas*; *bacillus*.

Introdução

Nematóides e bactérias convivem num mesmo habitat no solo, apresentando grande diversidade de espécies, além de existirem em abundância (SAYRE, 1980). A interação da comunidade biótica com o solo tem papel vital na sua fertilidade e na produção agrícola. Por isso o conhecimento dessa comunidade representa elemento-chave no desenvolvimento da agricultura sustentável (FONSECA et al. 2000).

Dentre os diversos gêneros de bactérias isolados da rizosfera e testados contra fitonematóides, as espécies do gênero *Pseudomonas*, principalmente as pertencentes ao grupo das fluorescentes, têm sido as antagonistas mais eficazes a esses patógenos, talvez devido à sua maior capacidade de colonização da rizosfera (KLUEPFEL et al. 1993). *Bacillus* é outro gênero de bactéria que vem sendo considerado como forte agente de controle biológico de fitonematóides devido à sua capacidade de produção de substâncias tóxicas (WELLER, 1988). Entretanto, outros gêneros e espécies têm demonstrado também antagonismo a fitonematóides (SIKORA, 1992, HALLMAN et al, 1995). Desta forma, a caracterização das espécies bacterianas em estudo poderá auxiliar na triagem de isolados com potencial para ser antagonista de fitonematóides. Contudo, na impossibilidade de se chegar à espécie o estudo da morfologia das colônias pode auxiliar na definição de grupos no espectro da diversidade da flora bacteriana e relacioná-los com sistemas agroecológicos e com antagonismo a fitonematóides.

Por se tratar de um resíduo rico em matéria orgânica, o lodo de esgoto pode colaborar no controle de doenças de plantas, especialmente as causadas por patógenos veiculados pelo solo. A supressão de doenças pelo lodo de esgoto tem forte relação com o aumento da atividade microbiana e o favorecimento da ação de microrganismos antagonísticos (MCILVEN e COLE, 1977; CRAFT e NELSON, 1996; BETTIOL e CAMARGO, 2000).

Poucos trabalhos têm sido realizados utilizando-se lodo de esgoto para

o controle de fitonematóides (HABICHT, 1975; CASTAGNONE-SERENO et al., 1988; CASTAGNONE-SERENO e KERMARREC, 1991; MANNION et al., 1994), porém sem relacionar sua ação com algum microrganismo nele presente.

Desta forma, objetivou-se neste trabalho isolar e caracterizar bactérias presentes nos lodos de esgoto das estações de tratamento de esgoto (ETE) de Franca (SP) e de Barueri (SP), visando estudos futuros de interação desses organismos com fitonematóides.

Materiais e Métodos

Isolamento de Bactérias do Lodo de Esgoto

Foram utilizados lodos provenientes das ETE de Franca e de Barueri, Estado de São Paulo. Para o isolamento foram utilizados 10g do lodo de esgoto uniformizados em liquidificador com 200mL de água destilada e esterilizada. Da suspensão, foi coletado 1mL e transferido para tubos contendo 9mL de água destilada e esterilizada, fazendo-se diluições em série até 10⁻⁸. Das diluições 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ foram pipetados 100mL para placa de Petri contendo o meio TSA (tripic soy agar) em 5 repetições. Essas placas foram levadas para incubadora (BOD) a 28°C ± 2°C e mantidos por 24 horas. A seguir, as colônias bacterianas formadas foram observadas quanto às características morfológicas. Aquelas caracterizadas como distintas, foram consideradas como diferentes isolamentos e repicadas para tubos, os quais foram mantidos em condições de temperatura de 0°C±2°C.

Caracterização Morfológica dos Isolados Bacterianos

Os isolados mantidos em condições de baixa temperatura foram repicados para meio TSA e incubados por 48 horas a 28°C ± 2°C. A seguir, foi realizada a avaliação visual comparando-se a morfologia das colônias com os esquemas apresentados por Klement et al., 1990 e Yano et al., 1993.

As colônias foram caracterizadas detalhadamente quanto à: (i) cor em branca, creme, creme escuro, amarelo e amarelo-escuro; (ii) forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizóide, fuso; (iii) elevação: achatada, elevada, convexa, convexa alta, ondulada; (iv) superfície: lisa, rugosa, papilada; (v) bordo: inteiro, ondulado, lobado, erosado, filamentoso, (vi) configuração da colônia: irregular, filamentosa, enrugada, granular, concêntrica. Alguns detalhes óticos foram caracterizados como: transparente, translúcido, opaco, brilhante e consistência da massa de crescimento da colônia como: viscosa ou pegajosa, butírica, seca, quebradiça, aquosa, gomosa.

Outra maneira usada para a caracterização dos isolados foi baseada na forma de crescimento em ágar inclinado. Os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio TSA inclinado e deixados em incubadora BOD a 28°C ± 2 por 48 horas. A seguir, foi realizada a avaliação visual das colônias, comparando-as com

os esquemas apresentados na figura 2 (adaptado de YANO et al., 1993). As formas de crescimento bacteriano em tubo foram caracterizadas como: filiforme, equinulado, rosário, difuso, arborescente, rizóide. A quantidade do crescimento foi caracterizada como: escasso, moderado e abundante.

A terceira forma de caracterização dos isolados bacterianos foi pelo crescimento em meio líquido para verificação de características específicas do crescimento bacteriano nesse tipo de meio.. Os isolados foram repicados para meio TSB (tryptic soy broth) em 100 mL do meio e mantidos a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por sete dias em agitador orbital, a 100 rpm. Os isolados foram caracterizados em floculento, anel, película e membranoso, de acordo com os esquemas apresentados por Yano et al., 1993.

Caracterização Bioquímica dos Isolados Bacterianos

Na caracterização bioquímica dos isolados bacterianos, foram utilizados os testes de solubilidade em KOH para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sem o uso de coloração (ROMEIRO, 2001).

A capacidade dos isolados em produzir pigmento fluorescente em meio King B foi avaliada em tubo inclinado onde foram repicados os isolados e incubados por 48 horas em BOD a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$. A seguir, as colônias produzidas foram examinadas sob luz ultravioleta a 365 nm. A presença de fluorescência caracterizou o isolado como produtor desse pigmento (MARIANO, 2000; SCHAAD et al. 2001). Utilizou-se como controle a bactéria *Pseudomonas cepaceae*, que produz esse pigmento.

Resultados e Discussão

Foram obtidos 77 isolados do lodo de Franca e 143 do de Barueri. Dos isolados de Franca testados, 77% foram Gram-positivos e 23% Gram-negativos (Tabela 1). Dos 143 isolados obtidos do lodo de esgoto de Barueri, 61% foram Gram-positivos e o restante Gram-negativo (Tabela 2). Os isolados Gram-positivos podem, talvez, ser *Bacillus* o qual tem várias espécies de grande importância como agentes de controle de fitopatógenos, inclusive nematóides. Daqueles Gram-negativos 39% dos isolados de Franca e 40% dos de Barueri produziram pigmento fluorescente em meio King B, sendo indicativo de *Pseudomonas fluorescens*.

Dos 77 isolados de Franca 12,98% apresentaram como característica morfológica bordo lobado, sendo esta uma característica de culturas de *Bacillus*. Comparando-os com os testes bioquímicos, concluiu-se que 80% deles eram Gram-positivos, reafirmando a suspeita de espécies de *Bacillus*. Dos isolados, 10% apresentaram bordo inteiro, colônia brilhante e arredondada, as quais são características de *Pseudomonas*. Desses, 37% foram Gram-negativos sendo que 67% desses isolados foram também produtores de pigmento fluorescente em meio

Tabela 1. Características apresentadas pelos isolados de bactérias obtidos do lodo de esgoto de Franca quando submetidos aos testes de solubilidade em KOH e de produção de pigmentos fluorescentes em meio King

Isolado	Gram	Fluorescência em meio King B	Isolado	Gram	Fluorescência em meio King B
F1	+	+	F41	+	+
F2	+	-	F42	-	-
F3	+	+	F43	+	-
F4	+	+	F44	-	-
F5	+	-	F45	+	+
F6	+	+	F46	-	+
F7	+	-	F47	+	+
F8	+	+	F48	-	+
F9	+	-	F49	+	-
F10	+	-	F50	-	+
F11	+	-	F51	+	-
F12	+	-	F52	+	-
F13	+	-	F53	+	+
F14	-	+	F54	+	-
F15	+	-	F55	+	-
F16	+	-	F56	+	+
F17	+	-	F57	+	-
F18	+	+	F58	+	+
F19	+	+	F59	+	-
F21	+	-	F60	+	-
F22	-	-	F61	-	-
F23	-	+	F62	+	-
F24	+	+	F63	+	+
F25	+	-	F64	-	-
F26	-	-	F65	+	+
F27	-	-	F66	+	-
F28	-	-	F68	+	+
F29	+	-	F69	-	+
F30	+	-	F70	-	+
F31	+	+	F71	+	-
F32	+	-	F72	+	-
F33	+	-	F73	+	+
F34	-	-	F74	+	-
F35	+	-	F75	-	-
F36	-	-	F76	+	-
F37	+	-	F78	+	-
F38	+	-	F79	+	-
F39	-	-	F80	+	+
F40	+	+			

Tabela 2. Características apresentadas pelos isolados de bactérias obtidos do lodo de esgoto de Barueri quando submetidos aos testes de solubilidade em KOH e de produção de pigmentos fluorescentes em meio King B

Isolados	Gram	Fluorescência em meio King B	Isolados	Gram	Fluorescência em meio King B
B3	-	+	B44	+	-
B4	+	+	B45	-	+
B6	-	-	B46	+	-
B7	+	-	B47	-	+
B9	-	+	B48	+	+
B10	+	+	B49	-	+
B13	-	+	B50	+	-
B15	-	-	B51	+	+
B16	-	-	B52	-	-
B17	+	+	B53	-	+
B18	-	+	B56	-	-
B19	-	-	B59	+	-
B20	+	-	B60	+	-
B21	+	+	B62	-	+
B22	-	-	B63	-	-
B23	+	-	B64	-	-
B24	+	+	B66	+	+
B25	+	-	B67	+	-
B26	+	-	B69	+	-
B28	+	+	B70	+	+
B29	-	-	B71	+	+
B30	+	-	B72	-	+
B32	-	+	B74	+	+
B33	+	-	B75	+	-
B34	+	+	B76	+	+
B35	-	-	B78	+	-
B36	+	-	B79	+	+
B37	-	-	B81	+	-
B38	+	-	B83	+	-
B39	-	+	B84	+	-
B40	+	-	B85	+	+
B41	-	-	B87	+	-
B42	-	-	B89	-	-
B43	-	-	B91	+	+
B92	-	-	B130	+	-
B93	+	-	B131	+	-
B94	-	-	B132	-	+
B95	+	+	B134	+	+
B96	+	-	B135	-	-
B97	-	-	B136	+	-

continua...

Tabela 2, cont.

Isolados	Gram	Fluorescência em meio King B	Isolados	Gram	Fluorescência em meio King B
B98	+	-	B137	+	+
B99	+	-	B138	+	-
B100	+	-	B139	-	-
B101	+	-	B140	+	-
B103	+	+	B141	+	-
B104	+	-	B142	+	+
B105	+	-	B143	+	-
B106	+	-	B144	+	-
B107	+	-	B145	+	-
B108	+	-	B146	+	-
B109	+	-	B147	-	+
B110	+	-	B148	-	-
B111	-	+	B149	+	-
B112	+	-	B150	+	-
B113	-	+	B151	-	-
B114	-	+	B152	+	-
B115	-	+	B153	+	-
B116	+	-	B154	-	+
B118	+	+	B155	-	-
B119	-	+	B156	+	-
B120	-	+	B157	+	-
B121	+	+	B159	+	-
B122	+	+	B160	+	+
B123	+	+	B161	+	+
B124	+	-	B162	+	+
B125	-	+	B163	-	-
B126	+	-	B164	-	-
B128	-	-	B165	+	-
B129	+	+			

B= Lodo de esgoto da ETE Barueri

F= Lodo de esgoto da ETE Franca

King B, características da *P. fluorescens*.

Dos 143 isolados de Barueri, 17% apresentaram bordo lobado como característica morfológica, podendo-se suspeitar de serem espécies de *Bacillus* e 5% apresentaram as características de espécies de *Pseudomonas*. Para os isolados do lodo de Barueri, na comparação com os testes bioquímicos obteve-se que 64% foram Gram-positivo, indicando *Bacillus*. Dos isolados com características de *Pseudomonas*, 17% apresentaram-se como Gram-negativas e dessas, 17% mostraram-se como produtoras de pigmento fluorescente em meio King B, que são características de

espécies de *Pseudomonas* do grupo fluorescente.

A predominância de isolados Gram-positivos do lodo de esgoto de Franca e de Barueri supõe, a possível a presença de *Bacillus*. Iizuka et al. (1962) encontraram também predominância dessa bactéria, a qual está envolvida na redução populacional de fitonematóides (WELLER, 1988).

Fonseca et al. (2000) encontraram maior frequência de grupo de bactérias do grupo fluorescentes em extrato de solo e em material orgânico. Embora algumas espécies de *Pseudomonas* do grupo fluorescente sejam conhecidas como patógenos, como *P. syringae*, muitos membros deste grupo têm sido considerados promissores no controle biológico como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs), pela produção de reguladores de crescimento vegetal e/ou outros metabólitos secundários que inibem patógenos de plantas, além da indução de resistência sistêmica.

Conclusões

Foram obtidos 77 isolados do lodo de Franca e 143 do de Barueri. Desses isolados de Franca, 77% foram Gram-positivos e 23% Gram-negativos. Para os isolados de Barueri, 61% foram Gram-positivos e os demais Gram-negativos. Daqueles isolados Gram-negativos 39% de Franca e 40% de Barueri produziram pigmento fluorescente em meio King B, sendo essa uma característica de *Pseudomonas* do grupo fluorescente.

Referências

- BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. *Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 312p.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; KERMARREC, A. Invasion of tomato roots and reproduction of *Meloidogyne incognita* as affected by raw sewage sludge. *Journal of Nematology*, v.23, p.728-734, 1991.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; KERMARREC, A.; CLAIRON, M. ANAIS, A. Effects de presseurs d'un apport de boue residuaire sur le parasitisme de *Meloidogyne incognita*. Méd. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 53/2b, 1988. p.879-883.
- CRAFT, C.M.; NELSON, E.B. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62; p.1550-1557, 1996.
- FONSECA, M.C.C. da; ZAGO, V.C.P.; FERREIRA, E.P. de B.; CÂMARA, A. de F.S.; RUMJANEK, N.G. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. *Comunicado Técnico: Embrapa Agrobiologia*, v. 43, dez., 2000. 4p.

HABICHT, W.A.Jr. The nematicidal effects of varies rates of raw and composted sewage sludge as soil organic amendments on root-knot nematode. *Plant Disease Reporter*, v.59; n.9, p.631-634, 1975.

HALLMAN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; SIKORA, R.A. Endophitic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* in cucumber. *Phytopathology*, St. Paul, v.85, n.10, p.1136, 1995.

IIZUKA, H.; KOMAGATA, T.; KUNII, Y.; SHIBUYA, M. Nematocidal action of microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v.26, n.2, p.199, 1962.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990.568p.

KLUEPFEL, D.A.; McINNIS, T.N.; ZEHR, E.I. Envolvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soils suppressive of the nematode *Criconemella xenoplax*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.83, n.11, p.1240-1245, Nov. 1993.

MANNION, C.M.B.; SCHAFFER, B.; OZORES, H.M. BRYAN, H.H., McSORLEY, R. Nematode population dynamics in municipal solid waste-amended soil during tomato and squash cultivation. *Nematropica*, v.24, p.17-24, 1994.

MARIANO, R.L.R. *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: O Autor, 2000. 171p.

McILVEN, W.D.; COLE JR, H. Influence of sewage sludge soil amendment on various biological control components of the corn field ecosystem. *Agriculture and Environment*, v.3, p.349-361, 1977.

ROMEIRO, R. da S. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: UFV, 2001. 279p.

SAYRE, R.M. Promising organisms for biocontrol of nematodes. *Plant Disease*, Saint Paul, v.64, n.6, p.526-532, 1980.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. *Plant Pathology Bacteria*. St. Paul: APS Press, 2001. 373p.

SIKORA, R.A. Management of the antagonistic potencial in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.30, p. 245-270, 1992.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.26, p.379-407, 1988.

YANO, D.M.Y.; FARRIS, M.G.; UMINO, C.Y.; COUTINHO, H.L.C.; CANHOS, V.P. *Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1993. 64p. il.