

UFRB

Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

YSLAI SILVA PEIXOUTO

**SCREENING DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS
PARA O CONTROLE DE *Aspergillus niger* EM SISAL**

CRUZ DAS ALMAS

2010

YSLAI SILVA PEIXOUTO

**SCREENING DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS
PARA O CONTROLE DE *Aspergillus niger* EM SISAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina TCC II do curso Ciências Biológicas na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito de avaliação.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

2010

P379

Peixoto, Yslai Silva.

Screening de uma coleção de bactérias para o controle de *Aspergillus niger* em sisal. / Yslai Silva Peixoto. – Cruz das Almas - Ba, 2010.
34f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
Área de Concentração: Ciências Biológicas.

1.Sisal. 2.Sisal – Controle biológico. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

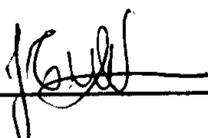
CDD: 633.59.

Yslai Silva Peixoto

**SCREENING DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O
CONTROLE DE *Aspergillus niger* EM SISAL**

Aprovado em: 13 / 12 / 2010

BANCA EXAMINADORA



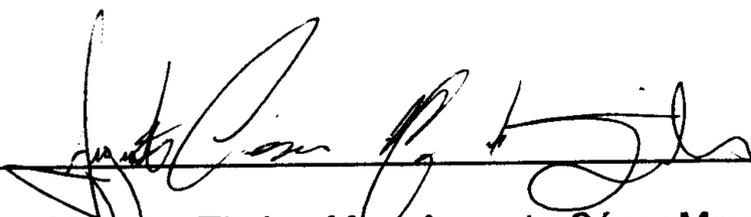
Orientador: Prof^o Dr. Jorge Teodoro de Souza

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB



Membro Titular: Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade

Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF



Membro Titular: Msc. Augusto César Moura da Silva

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB

DEDICO

A minha família
que sempre acreditou
em mim e contribuiu
para todas as minhas
conquistas!

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus por todas as graças alcançadas em minha vida.

A minha mãe Ysnarkaio por toda força, apoio, amor e incentivo ao estudo e por ter cuidado da minha princesa enquanto eu estava na faculdade. Ao meu pai Jorge pela confiança, incentivo e apoio. Ao meu irmão Farley pela amizade e confiança.

Á todos os familiares por estarem sempre presentes em minha vida e me incentivem.

Aos professores, grandes mestres com quem aprendi não só as teorias e as técnicas, mas também nos preparam para a vida. Muito obrigada pelo apoio de todos.

Á Maria Angélica pelo apoio no início da vida acadêmica e pelos ensinamentos. A Cláudia Fortes pela confiança, ensinamentos e paciência.

Ao meu orientador Jorge Teodoro pelo profissionalismo, contribuições e pela sapiência passada.

Á Augusto César pela paciência e apoio prático em relação ao trabalho. Á Juan pelo incentivo e amizade.

Á minha amiga Eliane, grande companheira de trabalho, com quem dividi muitas experiências no laboratório. A Eliana e Emanuelle pelo companherismo.

As Laboratoristas e amigas Lene e Nara pela colaboração e disposição em ajudar.

Á todos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e com a minha formação.

Aos meus amigos de curso, que sempre me incentivaram, apoiaram e acreditaram no meu potencial.

E principalmente aos amores da minha vida Ysali e Leandro. Muito obrigada pelo amor e carinho concedido, pela paciência de não estar sempre presente e pelo incentivo para que eu continuasse.

Enfim a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SCREENING DE UMA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE *Aspergillus niger* EM SISAL

RESUMO

Autor(a): Yslai Silva Peixoto

Orientador(a): Jorge Teodoro de Souza

O Brasil é o maior produtor de sisal (*Agave sisalana*) do mundo e o cultivo concentra-se na região semi-árida do Nordeste. A podridão vermelha do caule, causada por *Aspergillus niger*, é o principal fator limitante ao desenvolvimento da cultura. Entre as alternativas para o controle da doença destaca-se o uso de agentes de biocontrole, como bactérias do gênero *Bacillus* que apresentam potencial contra fitopatógenos. O presente estudo avaliou o potencial de uma coleção contendo isolados de bactérias supostamente classificados como *Bacillus* spp. no controle biológico de *A. niger*. Dos 358 isolados, 238 foram preservados em água estéril e glicerol 20%. Destes, 214 foram avaliados em bioensaios para o controle do fungo, sendo que três isolados apresentaram 100 % de inibição ao crescimento e esporulação do patógeno. Estes isolados também foram avaliados pelo método de PCR para confirmar a identidade dos isolados ao nível de gênero, verificando-se que 156 amplificaram o fragmento específico de *Bacillus* e 82 isolados não amplificaram. O uso desses agentes de biocontrole pode ser uma alternativa promissora.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., *Aspergillus niger*, controle biológico

SCREENING OF A BACTERIAL COLLECTION TO CONTROL *Aspergillus niger* IN SISAL

ABSTRACT

Author: Yslai Silva Peixoto

Adviser: Jorge Teodoro de Souza

Brazil is the world's biggest producer of sisal (*Agave sisalana*) and cultivation is concentrated in the semi-arid area of the Northeastern region. Sisal bole rot caused by *Aspergillus niger* is the main limiting factor for sisal production. Among the control methods, the use of biological agents such as *Bacillus* bacteria shows promise against several pathogens. The present study evaluated the potential of a collection of bacteria putatively identified as *Bacillus* against *A. niger*. Among the 358 strains in the bacterial collection, 238 were preserved in sterile water and in 20% glycerol. From these, 214 were evaluated in bioassays against *A. niger*. Three isolates showed 100% inhibition of fungal growth and sporulation. The identity of the isolates was confirmed by genus-specific PCR. One-hundred and fifty six isolates were identified as *Bacillus* by the specific primers while 82 were not amplified by the primers. These biological control agents might be a promising alternative to disease control.

Key-words: *Bacillus* spp., *Aspergillus niger*, biological control.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem dos 358 isolados da coleção do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB.....	22
Tabela 2. Isolados preservados em água e glicerol da coleção do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB.....	25
Tabela 3. Inibição de <i>Aspergillus niger</i> em disco de sisal por 214 isolados da coleção.....	26
Tabela 4. Amplificação do fragmento diagnóstico para o gênero <i>Bacillus</i> dos isolados pertencentes a coleção da UFRB.....	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Escala de notas utilizada no experimento de seleção de isolados de *Bacillus* contra *A. niger*..... 23
- Figura 2. PCR com primers específicos para *Bacillus spp.*..... 28

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	JUSTIFICATIVA.....	14
3.	OBJETIVO GERAL.....	14
3.1	Objetivos específicos.....	14
4.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1	A cultura do Sisal.....	15
4.2	A podridão vermelha do caule.....	17
4.3	Controle biológico de doenças de plantas.....	18
5.	METODOLOGIA.....	21
5.1	Recuperação e preservação dos microrganismos.....	21
5.2	Screening de isolados de <i>Bacillus</i> para o controle de <i>A. niger</i>	22
5.3	Extração de DNA.....	23
5.4	PCR para amplificação e separação de gel de agarose 0,8%.....	23
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1	Preservação dos isolados.....	24
6.2	Screening de isolados de <i>Bacillus</i> para o controle de <i>A. niger</i>	25
6.3	Confirmação da identidade dos isolados por PCR.....	26
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial da fibra de sisal (*Agave sisalana*), com uma produção anual de mais de 135 mil toneladas (SILVA & COUTINHO, 2006). Do sisal é extraída a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a aproximadamente 70 % de todas as fibras desse tipo (MARTIN *et al.*, 2009). O cultivo de sisal concentra-se na região Nordeste, sendo os Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte os principais produtores, com 93,5, 3,5 e 3,0 %, respectivamente (MATTOSO, *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2000). No Nordeste brasileiro, a cultura do sisal é responsável pela geração de emprego e renda, assumindo significativa relevância sócio-econômica. Na maior parte dos cultivos, a mão de obra familiar é responsável pela manutenção, colheita e desfibramento do sisal. Esta é uma das poucas atividades agrícolas na Região semi-árida e uma das melhores alternativas de desenvolvimento para o semi-árido baiano (PROSSIGA, 2007).

Um dos principais problemas fitossanitários que limita a produtividade do sisal é a podridão vermelha do caule, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger*. Segundo Nielsen *et al.* (2009), *Aspergillus niger* apresenta rápido crescimento, tolerância ao pH, e abundância em diversos ambientes. Entre as alternativas para o controle da doença, o uso de microrganismos antagonistas ao fitopatógeno pode ser uma ferramenta viável. Dentre estes, *Bacillus* spp. destacam-se como eficientes agentes de controle biológico (TEIXEIRA *et al.*, 2008; ARAÚJO & GUERREIRO, 2010). As bactérias do gênero *Bacillus* são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, Gram-positivas em forma de bastonete, produzem endósporos e são amplamente distribuídas no ambiente (WU *et al.*, 2006). Estas bactérias têm apresentado resultados satisfatórios em diversos estudos de biocontrole de doenças de plantas. A atividade contra fitopatógenos deve-se ao fato desses agentes poderem atuar por diversos mecanismos de ação, tais como indução de resistência sistêmica, produção de antibióticos e sideróforos (MONTEIRO *et al.*, 2005).

O estudo teve como objetivo recuperar e preservar isolados de *Bacillus* spp. da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Além disso, foram feitos estudos sobre o potencial de *Bacillus* spp. no controle de *A. niger*.

2. JUSTIFICATIVA

O sisal é fonte de renda para diversas famílias brasileiras, sobretudo, é uma das poucas alternativas agrícolas para a região semi-árida do Nordeste do País. Essa cultura, nos últimos anos, vem apresentando um decréscimo na produção devido ao fungo *A. niger*, agente causal da podridão vermelha do caule. Esta doença inviabiliza a utilização da fibra de sisal e causa grandes prejuízos aos agricultores. O controle por meio de métodos alternativos de baixo custo, e ambientalmente seguros, como o controle biológico, são desejáveis e merecem ser investigados. Bactérias do gênero *Bacillus* são promissoras por serem ativas contra patógenos de plantas, por meio da produção de antibióticos ou indiretamente por ativarem as defesas da planta. No Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia existe uma coleção de bactérias tentativamente classificadas como *Bacillus* spp. e, considerando o potencial desse gênero no controle de diversas doenças de plantas, esta deve ser testada também contra a podridão vermelha, que é um dos temas estudados de forma integrada no laboratório.

3. OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial de uso de *Bacillus* spp. no controle biológico de *Aspergillus niger*.

3.1 Objetivos específicos

- Recuperar e preservar isolados supostamente identificados como *Bacillus* spp. da coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB;
- Selecionar os isolados de *Bacillus* spp. da coleção quanto a capacidade antagônica ao fungo *A. niger*;
- Confirmar a identidade dos isolados por meio da técnica PCR.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A cultura do Sisal

O Sisal (*Agave sisalana* Perrine) é uma espécie xerófila resistente a secas prolongadas e altas temperaturas, pertencente à família Agavaceae, subfamília Agavoidea e à classe das monocotiledôneas. É originária da península de Yucatan, no México, e é cultivada no leste da África, Brasil, Haiti, Índia e Indonésia (MATTOSO *et al.*, 1997; SUINAGA *et al.*, 2006). No Brasil, as primeiras mudas de sisal foram introduzidas na Bahia em 1903, sendo esta a única espécie do gênero *Agave* cultivada comercialmente no país (MARTIN, 2001).

Cerca de 4,5 milhões de toneladas da fibra de sisal são produzidos a cada ano em todo o mundo (LI *et al.*, 2000). O sisal é a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a aproximadamente 70% da produção comercial de todas as fibras desse tipo (MARTIN *et al.*, 2009). O maior produtor e exportador mundial de fibras de sisal e de sisal manufaturado é o Brasil (SILVA & BELTRÃO, 1999; MARTINS, 2001) e aproximadamente 70% do sisal brasileiro beneficiado destina-se aos mercados europeu e asiático. Já o sisal manufaturado tem como principais importadores os Estados Unidos (86%) e o Canadá (5%). A produção nacional de fibras de sisal já alcançou mais de 135 mil toneladas, destas, 113 mil foram exportadas, sendo 26% de fibras e 74% de manufaturados (SILVA & COUTINHO, 2006; MARTINS, 2001).

O sisal é cultivado em larga escala no Nordeste brasileiro, e, devido à sua perfeita adaptação ao clima semi-árido e resistência à seca, acabou se transformando na principal cultura de várias áreas da região (PIZARRO *et al.*, 1999). Apresentando facilidade de cultivo por crescer em todos os tipos de ambientes (JOSEPH *et al.* 1999). O cultivo de sisal concentra-se na região Nordeste, sendo os Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte os principais produtores, com 93,5, 3,5 e 3,0 %, respectivamente (MATTOSO *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000). Na Bahia, o sisal representa o segundo produto na pauta de exportações agrícolas (SILVA *et al.*, 1993), apresentando uma produção anual de fibra equivalente a 245, 389 t (IBGE, 2007). Além de constituir fonte de renda e emprego para um grande contingente de trabalhadores, é um importante agente de fixação do homem à

região semi-árida nordestina, sendo, em algumas dessas regiões, a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios, concentrando-se em áreas de pequenos produtores, com predomínio do trabalho familiar (MARTIN *et al.*, 2009).

A fibra é extraída das folhas, que possuem de 8 a 10 cm de largura e de 150 a 200 cm de comprimento. Da folha se obtém de 3 a 5% do seu peso em fibra. Os 95 a 97% restantes constituem os chamados resíduos do beneficiamento, que são utilizados como adubo orgânico, ração animal e pela indústria farmacêutica (FARIA *et al.*, 2008). A fibra do sisal, beneficiada ou industrializada, representa cerca de 80 milhões de dólares em divisas para o Brasil, além de gerar mais de meio milhão de empregos diretos e indiretos por meio de sua cadeia de serviços, que começa com as atividades de manutenção das lavouras, colheita, desfibramento e beneficiamento da fibra e termina com a industrialização e confecção de artesanato (MATTOSO *et al.* 1997; SILVA & COUTINHO, 2006).

Nos últimos anos, o interesse da indústria pelo uso de fibras naturais para o reforço de plásticos e a obtenção de materiais com desempenho mecânico e térmico adequado, tem aumentado significativamente (JOSEPH *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000; MARTIN, 2001; MARTINS, 2001). A utilização de fibras naturais em substituição às fibras sintéticas vem crescendo principalmente por serem biodegradáveis, atóxicas, de fontes renováveis e apresentarem baixo custo, o que condiz com os atuais esforços de proteção ao meio ambiente (LI *et al.*, 2000; MARTIN, 2001; MARTINS, 2001), além de fornecer benefícios sociais (LOPES *et al.*, 2010). A fibra de sisal tem um melhor desempenho para aplicações comerciais devido ao seu maior módulo de elasticidade, resistência ao impacto e maior tração moderada e forças de flexão, quando comparado a outras fibras vegetais (PAVITHRAN *et al.*, 1988). De acordo com Morassi (1994) a fibra de sisal é considerada como uma alternativa à fibra de vidro e pode ser satisfatoriamente usada como agente de reforço em produtos plásticos para diversas aplicações na indústria de automóveis, incluindo forro interno, acessórios externos e internos, painel de instrumentos, malas de ferramentas, cabine / encapsulamento do motor e pára-choques. Além da indústria automobilística, a fibra de sisal é também utilizada na fabricação de cordas, barbante, cabos marítimos, tapetes, sacos, vassouras, estofamentos, e artesanato. Além disso, na fabricação de pasta celulósica para produção do papel Kraft de alta resistência, e de outros tipos de papel fino, como para cigarro, filtro, absorvente higiênico, fralda, entre outros (SILVA & COUTINHO, 2006; MARTINS, 2001).

4.2 A podridão vermelha do caule

Apesar da rusticidade e resistência da planta ao ataque de insetos e fitopatógenos, pois ela apresenta uma barreira natural a penetração de microrganismos composta pela epiderme da folha que possui uma cutícula espessa e cerosa, o sisal pode ser afetado por doenças capazes de causar sérios prejuízos à cultura (BOCK, 1965; MEDINA, 1954). Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas-chaves nos metabolismos primário e secundário (ARAÚJO & MENEZES, 2009).

Atualmente, na Bahia, tem sido constatado um aumento significativo na incidência da podridão vermelha do caule do sisal, também conhecida como podridão vermelha do sisal, podridão do cepo e podridão úmida do cepo ou ainda podridão parda do colo, que resulta em perdas consideráveis para os produtores (SÁ, 2009).

A podridão vermelha tem afetado a cultura do sisal desde a década de 1970, atingindo níveis críticos a partir de 1998 nas principais áreas produtoras dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte (SÁ, 2009). Na Bahia, a incidência da doença varia entre as regiões de cultivo, sendo que em algumas não ultrapassa 5 % da área enquanto que em outras pode alcançar 65 % de incidência (SÁ, 2009). A doença apareceu pela primeira vez no Brasil no Estado da Paraíba, segundo dados de Machado (1951), citado por Medina (1954). Na Bahia, foi constatada pela primeira vez por pesquisadores da Embrapa Semi-Árido e EBDA, na fazenda Mandacaru, município de Santaluz - BA, em um plantio comercial de 3.500 hectares de sisal (LIMA *et al.*, 1998).

A planta com a podridão vermelha fica amarelada e murcha, o caule apodrece e se desprende facilmente do solo, levando a planta à morte. Devido ao clima, alguns produtores acreditam que o problema é causado pela seca (LIMA *et al.*, 1998). As plantas de sisal infectadas pelo patógeno sobrevivem por algum tempo, por que o apodrecimento do caule, resultante da colonização pelo patógeno, ocorre de forma lenta (BOCK, 1965). As folhas de plantas afetadas pela podridão vermelha não servem para o desfibramento e aproveitamento da fibra e as plantas sintomáticas morrem com o progresso da doença.

Apesar da grande importância para a Região semi-árida do país, o sisal ainda é uma cultura pouco estudada e existem poucos relatos na literatura científica de estudos sobre a podridão vermelha do caule de sisal, bem como de métodos de controle dessa doença.

O agente causal da podridão vermelha do caule de sisal é o fungo *Aspergillus niger* que é um ascomiceto filamentoso, mitospórico típico de solo e saprófita, pertencente à ordem Moniliales (SÁ, 2009). Este fungo caracteriza-se por conidióforos hialinos a marrons, cabeças conidiais radiadas, com métulas e fiálides ou somente fiálides, conídios escuros e globosos, medindo 4-5 μ de diâmetro (BAKER & BENNETT, 2008). Causa doenças como podridão do colo do amendoim, ocorrendo normalmente em solos com baixa matéria orgânica (MORAES & GODOY, 1997) e doenças de pós-colheita e armazenamento de produtos agrícolas (LIMA & ARAÚJO, 1999). A capacidade de penetração e colonização de *A. niger* está na dependência do estado em que se encontra o hospedeiro. Quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção (ROGER, 1953 citado por SOUZA FILHO *et al.*, 1979).

Para o crescimento deste fungo no interior do tecido hospedeiro é necessária a ação de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede das células vegetais (AGRIOS, 2004). A ação dessas enzimas pode estar intimamente relacionada à patogenicidade e agressividade de *A. niger*, pois possivelmente os isolados mais agressivos, estão bem adaptados à planta, e apresentam uma maior expressão de genes codificadores dessas enzimas.

4.3 Controle biológico de doenças de plantas

De acordo com Bettiol e Morandi (2009) o uso intenso de agrotóxicos para o controle de pragas, doenças e plantas invasoras na agricultura, gera diversos problemas ambientais, como a contaminação do solo, água, alimentos, a intoxicação de animais e agricultores, assim como a resistência de fitopatógenos a certos princípios ativos dos agrotóxicos. A forte pressão de seleção causada por esses produtos resultam na seleção de microrganismos resistentes (SÁ, 2009). Devido ao tempo que os produtos químicos demoram para serem degradados, essas substâncias acabam sendo acumuladas em concentrações elevadas na cadeia

alimentar. Os métodos de controle de doenças de plantas vem sendo aperfeiçoados a fim de assegurar o uso racional dos produtos químicos, diminuindo assim os riscos a saúde humana e ao meio ambiente (SÁ, 2009).

A preocupação da sociedade com o uso de agrotóxicos e seus impactos vem fazendo com que o mercado de produtos agrícolas orgânicos e ecologicamente corretos cresça a passos largos. O uso de agrotóxicos é um assunto que permeia a agenda ambiental de diversos países (BETTIOL *et al.*, 2008). Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos o controle biológico é um dos mais discutidos. Tanto o controle biológico natural quanto a introdução de agentes de controle biológico podem ser explorados.

Existem diversas possibilidades para o uso de agentes biológicos, dentre esses podem ser citados: estirpes fracas de CTV para premunização contra a tristeza dos citros; estirpes fracas de PRSV-W para premunização contra o mosaico da abobrinha; *Hansfordia pulvinata* para o controle do mal-das-folhas da seringueira; *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro; *Clonostachys rosea* para o controle do mofo cinzento; *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças; *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos de solo e substrato e da parte aérea (BETTIOL & MORANDI, 2009). Infelizmente poucos estão disponíveis na forma de produtos comerciais.

Doença, na abordagem de controle biológico, é o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não-patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou a resistência do hospedeiro (COOK & BAKER, 1983; COOK, 1985). Além disso, o clima afeta os organismos com os quais a planta, o patógeno e os antagonistas interagem, como microrganismos endofíticos e saprófitas (BETTIOL & MORANDI, 2009).

O controle biológico de doenças de plantas iniciou-se como ciência em 1926, quando B. B. Sanford publicou um trabalho sobre fatores que afetavam a patogenicidade de *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna na batateira. Em 1931, Sanford e W. C. Broadfoot empregaram pela primeira vez o termo 'controle biológico' em um artigo sobre o mal-do-pé do trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis* (BAKER & COOK, 1974). Dentre as várias definições para controle biológico, a de maior aceitação entre pesquisadores dessa área de atuação é descrita por Baker e Cook (1974) como sendo a redução da densidade do inóculo ou

das atividades determinantes da doença por um patógeno ou parasita, promovida por um ou mais organismos que não o homem, favorecidos naturalmente ou pela manipulação do seu habitat ou ambiente, hospedeiros ou antagonistas ou pela manipulação em massa de um ou mais antagonistas. O controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como sendo o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo, sendo uma íntima interação patógeno com o hospedeiro influenciada pela ambiente (BETTIOL & MORANDI, 2009).

Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (BETTIOL, 1991). O controle biológico pode ser auxiliado por meio de práticas culturais, criando um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos; com uso do melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou ainda com a introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos (BETTIOL & MORANDI, 2009). O controle biológico almeja manter, através de certas práticas, um equilíbrio no agroecossistema, de modo que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos não patogênicos no sistema (BETTIOL, 1991). O microrganismo utilizado no controle biológico por ser exógeno ao ambiente, geralmente tem pouca persistência, devendo ser reaplicado com frequência (LUMSDEN & LOCKE, 1989).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial antagonista podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*, em condições controladas ou naturais, sendo ambos os métodos complementares. É preciso, conhecer os fatores ecológicos que podem afetar o desempenho e, adotar práticas de manejo adequadas para favorecer a sua permanência e atividade no ambiente (LUMSDEN & LOCKE, 1989). Antes que o controle biológico chegue a ser um componente importante no manejo de enfermidades de plantas, ele deve ser efetivo, confiável, consistente e econômico (BETTIOL & MORANDI, 2009). E para alcançar esses critérios, devem ser selecionados isolados superiores juntamente com sistemas de aplicação que complementem a atividade biocontroladora (LUMSDEN & LOCKE, 1989). Para Okigbo (2005) o controle biológico é potencialmente mais durável, mais barato e há

vários casos em que demonstrou-se ser uma alternativa viável aos produtos químicos em condições de campo.

As bactérias do gênero *Bacillus* são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, gram-positivas em forma de bastonete, produzem endósporos e são amplamente distribuídas no ambiente (WU *et al.*, 2006). Elas são comuns no solo, somente algumas são patogênicas a humanos e diversas espécies produzem antibióticos (TORTORA *et al.*, 2005).

Estas bactérias são comumente empregadas no controle de doenças de plantas. Controle que é exercido por meio de uma variedade de mecanismos de ação, como a indução de resistência sistêmica da planta e produção de antibióticos peptídicos (MONTEIRO *et al.*, 2005). Os membros do gênero *Bacillus* têm desempenhado um duplo papel significativo em muitas atividades humanas (WU *et al.*, 2006). Por um lado, espécies como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis* são utilizados industrialmente para a produção de enzimas, antibióticos, solventes e outras moléculas (GERHARTZ, 1990).

Diversas espécies do gênero *Bacillus* tem demonstrado potencial no controle biológico de doenças de plantas (HANDELSMAN *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 1995; OKIGBO, 2002; OKIGBO & OSUINDE 2003; SILVA *et al.*, 2004; EDGEComb & MANKER, 2008).

5. METODOLOGIA

5.1 Recuperação e preservação dos microrganismos

Foi utilizada uma coleção com 358 isolados de bactérias tentativamente classificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* e armazenada no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) (Tabela 1). Esta coleção foi mantida por pelo menos 3 anos em tubos de microcentrífuga com glicerol 20% armazenados em freezer -20 °C. Para sua recuperação os isolados foram estriados em meio TSA (trypticase-soy-ágar) e incubados por 24 h a 25 °C. As colônias isoladas foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo água esterilizada e mantidos em temperatura ambiente.

Todos os isolados foram preservados em glicerol 20 % a -20 °C

Tabela 1. Origem dos 358 isolados da coleção do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB.

Origem	Solo	Raiz
Banana	117	116
Cravo de defunto	28	11
Crotalaria	64	22

5.2 Screening de isolados de *Bacillus* para o controle de *A. niger*

Para os testes de inibição, os isolados foram cultivados em erlenmeyers contendo 15 ml de meio nutriente líquido por 20 horas a 25 °C sob agitação a 100 rpm. Dois mililitros da cultura foram coletados e centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água destilada esterilizada e depois centrifugado. A concentração da suspensão bacteriana foi padronizada em espectrofotômetro ($A_{550} = 0,05$).

O fungo *Aspergillus niger* foi obtido de plantas sisal com sintomas da doença no município de Barrocas. O patógeno foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) durante 5 dias a 25 °C. Uma suspensão de esporos foi preparada adicionando-se 1 ml de água destilada esterilizada e uma gota de tween 20 por placa e raspando-a com uma alça de Drigalski. A concentração da suspensão foi ajustada para 10^7 conídios/ml em uma câmara de Neubauer. Discos de caule de sisal foram obtidos de plantas sadias mantidas na área experimental do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB. Os caules foram cortados em fatias de 0,5 cm de espessura e o diâmetro foi padronizado com um vazador de metal de 1 cm. Os discos foram imediatamente submersos em água com a finalidade de evitar a oxidação. A desinfestação superficial dos discos foi feita por imersão em álcool 70 % e NaOCl 1 % por 5 minutos, seguida de três lavagens em água destilada e esterilizada. Os discos de sisal foram acondicionados em potes plásticos com papel de filtro umedecidos no fundo. Cada pote plástico recebeu um disco de sisal, que constituiu a parcela experimental. Uma alíquota de 100 µl da suspensão bacteriana foi

transferida com o auxílio de uma pipeta e após 3 horas foram transferidos 100 µl da suspensão de *A. niger*. Os tratamentos foram compostos de um controle com água estéril, outro apenas com o fungo, e os demais com a aplicação de cada isolado bacteriano testado. O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições.

Cinco dias após a inoculação, procedeu-se a avaliação dos resultados com base em uma escala de notas variando entre 1 e 5 (Figura 1).



Figura 1. Escala de notas utilizada no experimento de seleção de isolados de *Bacillus* contra *A. niger*, onde 1 corresponde ao disco sem crescimento micelial e sem esporulação; 2 crescimento micelial em até metade do disco; 3 crescimento micelial em todo o disco; 4 esporulação em metade do disco; 5 esporulação em todo o disco

5.3 Extração de DNA

Os isolados de *Bacillus* spp. da coleção foram cultivados em meio TSA e incubados por 24 horas a 25 °C. Para a extração de DNA, as colônias bacterianas foram transferidas para tubos de microcentrifuga contendo 100 µl de solução tampão (SDS 25 % + NaOH 0,05 M) para a lise das células. A mistura foi fervida por 15 minutos e em seguida, os microtubulos foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm. O sobrenadante contendo DNA foi coletado e diluído 20 X em água estéril.

5.4 PCR para amplificação e separação de gel de agarose 0,8%

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para a confirmação da identidade dos isolados da

coleção como *Bacillus*. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, (pH 8,3), MgCl₂ 2 mM, 200 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) [Promega], 20 pmol de cada primer (Sinapse), 1 U da Taq polimerase e 30 ng de DNA. Os primers específicos para o gênero *Bacillus* utilizados: B-K1/F, 5'-TCACCAAGGCRACGATGCG-3'e B-K1/R1, 5'-CGTATTCACCGCGGCATG-3' (WU *et al.*, 2006). As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), programado com a seguinte seqüência de passos: 94 °C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anelamento de primers a 63 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos. Após os 25 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C. Após a amplificação as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Os geis foram fotodocumentados e foi observada a presença ou ausência da banda de 1114-pb, específica para o gênero *Bacillus*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Preservação dos isolados

Dos 358 isolados pertencentes a coleção, 238 (66,48 %) foram recuperados e preservados em água estéril e mantidos à temperatura ambiente e também em glicerol 20 % e mantidos a - 20 °C (Tabela 2). Cento e vinte isolados não puderam ser recuperados, pois não apresentaram nenhum crescimento em meio de cultura. É possível que pelo menos parte desses isolados tenha se tornado viável, mas não cultivável (VBNC) (WAINWRIGHT *et al.*, 2004).

Tabela 2. Isolados preservados em água e glicerol da coleção do laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB.

Origem	Solo	Raiz
Banana	93	49
Cravo de defunto	24	06
Crotalaria	55	11

O método de preservação visa a manutenção da viabilidade e proporcionar estabilidade genética ao isolado, pelo período mais longo possível. Características desejáveis em um método de preservação são simplicidade, o não requerimento de equipamentos sofisticados, baixo custo, rapidez de execução e, obviamente, elevado grau de eficiência (ROMEIRO, 1996).

6.2 Screening de isolados para o controle de *A. niger*

O ensaio *in vitro* foi realizado em discos de sisal com 214 isolados (59,78 %) da coleção e apenas três inibiram 100 % do crescimento e esporulação de *A. niger* (Tabela 3). Desses três isolados, dois são oriundos de solo cultivado com cravo de defunto e crotalaria respectivamente e o terceiro foi obtido da rizosfera de crotalaria. A maior parte dos isolados testados não inibiu ou apresentou baixa atividade contra *A. niger*, o que pode ser notado pelo número de isolados com nota entre 3 e 5 (Tabela 3).

Outros autores, como por exemplo Monteiro *et al.* (2005) também encontraram um baixo número de isolados do gênero *Bacillus* inibindo patógenos de plantas.

Segundo Knudsen e Spurr Jr. (1986), a habilidade de bactérias formadoras de esporos como é o caso de *Bacillus* spp. permanecerem metabolicamente dormentes por longos períodos, aumenta sua sobrevivência, possibilitando sua permanência em períodos secos, em temperaturas extremas e na deficiência temporária de nutrientes. Essas características são desejáveis para as regiões semi-áridas, onde o sisal é cultivado. Dessa maneira, o presente estudo evidenciou o potencial dessas bactérias no controle biológico da podridão vermelha do caule. Os próximos passos

deverão envolver estudos *in vivo* para avaliar a atividade dos isolados selecionados.

Tabela 3. Inibição de *Aspergillus niger* em disco de sisal por 214 isolados da coleção.

Origem		Notas*					
		1	1,1-1,9	2,0-2,9	3,0-3,9	4,0-4,9	5
Banana	Raiz	-	-	3	6	22	11
	Solo	-	1	2	10	36	36
Cravo de defunto	Raiz	-	-	-	4	2	1
	Solo	1	1	-	6	6	10
Crotalaria	Raiz	1	-	-	1	7	1
	Solo	1	-	1	4	21	19
Total de isolados		3	2	6	31	94	78

* As notas utilizadas variaram de 1 a 5, de acordo com o crescimento e esporulação do fungo sobre discos de caule de sisal. As médias foram divididas nos intervalos apresentados na tabela.

6.3 Confirmação da identidade dos isolados por PCR

Todos os 238 isolados preservados foram testados para a confirmação da identidade (Figura 2). Cento e cinquenta e seis foram classificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, pois o fragmento específico de 1114-pb foi amplificado, e em 82 isolados o fragmento correspondente ao gênero *Bacillus* não foi amplificado (Tabela 4).

Tabela 4. Número de isolados pertencentes a coleção amplificados por primers específicos para o gênero *Bacillus*.

Origem		<i>Bacillus</i>	Não confirmados
Banana	Solo	72	21
	Raiz	35	14
Cravo de defunto	Solo	13	11
	Raiz	0	6
Crotalaria	Solo	31	24
	Raiz	5	6
Total		156	82

A amplificação por PCR do fragmento de 1114-pb específico para o gênero *Bacillus* confirma a identidade dos isolados.

Os isolados não amplificados pela reação de PCR podem de fato não pertencer ao gênero *Bacillus* ou o DNA pode ter sido degradado em qualquer etapa do processo.

Dos três isolados que inibiram 100 % do crescimento e esporulação de *A. niger*, apenas um foi classificado como pertencente ao gênero *Bacillus*, pois apresentou amplificação no fragmento específico ao gênero, e este isolado é oriundo de solo de crotalária.

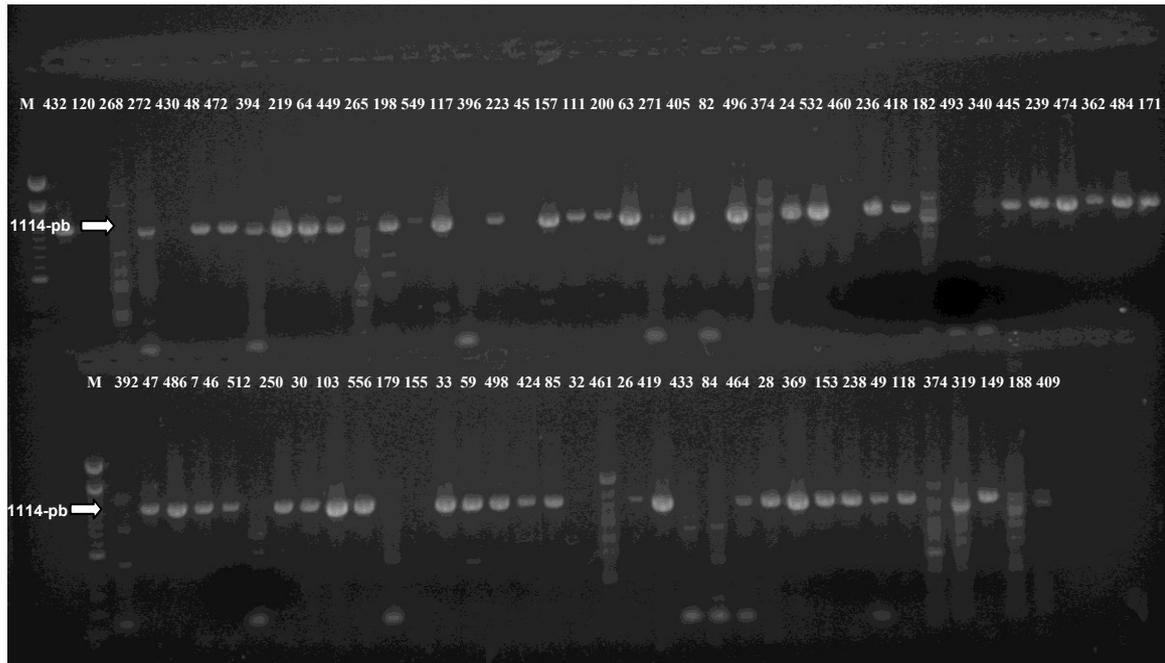


Figura 2. PCR com primers específicos para *Bacillus*. A seta indica a banda de 1114 pb, característica do gênero. M - marcador de peso molecular 100 kb.

7. Considerações finais

A cultura de sisal possui um importante papel econômico e social nas regiões semi-áridas do nordeste brasileiro. No entanto, poucas informações científicas estão disponíveis sobre a cultura do sisal e a podridão vermelha, tanto na literatura nacional quanto internacional.

Este trabalho permitiu que uma coleção de bactérias do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia da UFRB fosse recuperada, preservada, organizada em uma planilha eletrônica e classificada por PCR com primers específicos. A maior parte das bactérias testadas não apresentaram efeito antagônico contra *A. niger*.

Dentre os 214 isolados testados, apenas três inibiram 100% o crescimento e esporulação de *A. niger* e destes, apenas um era pertencente ao gênero *Bacillus* que é o isolados oriundo de solo de crotalaria.

Estudos futuros deverão ser conduzidos para o estudo dos isolados mais promissores em casa-de-vegetação e no campo, bem como elucidar o modo de ação desses isolados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N., How pathogens attack plants. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 5th. Elsevier Academic Press, p.177-203, 2004.
- ARAÚJO, F. F. e GUERREIRO, R. T., Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência agrotecnica**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, 2010.
- ARAÚJO, F. F. e MENEZES, D., Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.169-172, 2009.
- BAKER, K. F.; COOK, J., **Biological control of plant pathogens**. San Francisco. American Phytopathological Society, 1974.
- BAKER S. E; BENNETT J. W., An overview of the Genus *Aspergillus* in: Goldman H. G. & Osmani S. A. **The *Aspergilli*: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods**, Volume 26, CRC Press Taylor & Francis Group, New York, 2008.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B., **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP. Embrapa-CNPMA. 1º edição, 341p, 2009.
- BETTIOL, W., Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna-SP. Embrapa-CNPMA, PP. 1-5, 1991.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; KRAUSS, U.; STEFANOVA, M. e PRADO, A. M. C., Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba. FEALQ. pp. 303-331, 2008.
- BOCK, K.R., **Diseases of sisal**. World Crops, v.17, n.1, p.64-67, 1965.
- COOK, R. J. e BAKER, K. F., **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul. A P S, 1983.
- COOK, R. J., **Biological control of the pathogens: theory to application**. *Phytopathology* 75: 25-29, 1985.
- EDGECOMB, D. W.; MANKER, D. C., Serenade (*Bacillus subtilis* strain QST713) and Sonata (*Bacillus pumilus* strain QST2808), new biological tools for integrated and organic disease control programs. **Summa Phytopathologica**. 34S:196-199, 2008.

- FARIA, M. M. S.; JAEGER, S. M. P. L.; OLIVEIRA, G. J. C.; OLIVEIRA, R. L.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, F. S., Composição bromatológica do co-produto do desfibramento do sisal tratado com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.3, p.377-382, 2008.
- GERHARTZ, W., **Enzymes in Industry: Production and Applications**. Weinheim, F.R.D., New York, NY, USA, 1990.
- HANDELSMAN, J., RAFFEL, S., MESTER, E. H., WUNDERLICH, L., GRAU, C. R., Biological Control of Damping-Off of Alfalfa Seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Appl. Environm. Microbiol.**, 56: 713-718, 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA - **IBGE**. Produção Agrícola Municipal, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2007/comentario.pdf>>. Acesso em: 14/12/2010.
- JOSEPH, K.; TOLÊDO FILHO, R. D.; JAMES, B.; THOMAS, S.; CARVALHO, L. H., A review on sisal fiber reinforced polymer composites. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.3, n.3, p.367-379, Campina Grande, PB, DEAg/UFPB, 1999.
- KIM, B. S.; CHO K. C.; KIM, B. S.; CHO, K. Y., Antifungal effects on plant pathogenic fungi and characteristics of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis* isolated from sclerotia of *Rhizoctonia solani*. **Korean J Plant Pathol**, 11(2): 165–172, 1995.
- KNUDSEN, G. R.; SPURR, J. R. H. W., Management of bacterial populations for foliar disease biocontrol. In: MUKERJIL, K. G.; GARG, K. L. (Eds.) **Biocontrol of Plant Diseases**. Boca Raton FL. CRC Press. pp. 83-92, 1986.
- LI, Y.; MAI, Y-W.; YE, L., Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. **Composites Scienci and Technology**. vol. 60, p. 2037-2055, 2000.
- LIMA, E. F.; ARAÚJO, A. E., Fungos causadores de tombamento, transportados e transmitidos através da semente de amendoim. **Revista Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 3, n. 2, p. 71-76, 1999.
- LIMA, E. F.; MOREIRA, J. A. N.; BATISTA, F. A. S.; SILVA, O. R. R. F. da; FARIAS, F. J. C.; ARAÚJO, A. E., Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.
- LOPES, F. F. M.; ARAÚJO, G. T.; NASCIMENTO, J. W. B.; GADELHA, T. S.; SILVA, V. R., 2010. Estudo dos efeitos da acetilação em fibras de sisal. **Revista Bras. Eng. Agrícola Ambiental**, v.14, n.7, p.783–788, 2010.
- LUMSDEN, R.D; LOCKE, J.C., Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soiless mix. **Phytopathology**, v.79, p.361-366, 1989.

- MARTIN, A. R., **Caracterização e Modificação de Fibras de Sisal por Plasma a Frio Visando Aplicação em Compósitos Poliméricos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2001.
- MARTIN, A. R.; MATINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R., Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. *Polímeros. Ciência e Tecnologia*, vol. 19, nº 1, p. 40-46, 2009.
- MARTINS, M. A., **Fibra de Sisal: Mercerização, Acetilação e Aplicação em Compósitos de Borracha de Pneu Triturado**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
- MATTOSO, L. H. C.; FERREIRA, F. C.; CURVELO, A. A.S., Sisal fiber: Morphology and applications in polymer composites. In: LEÃO, A. L.; CARVALHO, F. X.; FROLLINI, E. , **Lignocellulosic-plastics composites**, São Paulo: USP/UNESP, p.21-51, 1997.
- MEDINA, J. C., **O sisal**, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, São Paulo, 1954.
- MONTEIRO, L.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M., Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Vol.48, n. 1 : pp. 23-29, 2005.
- MORAES, S. A.; GODOY, I. J., Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIN, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, p.1-43, 1997.
- MORASSI, J. O., **Fibras naturais: aspectos gerais e aplicação na indústria automobilística**. Mercedes Benz of Brazil, 1994.
- NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T O.; FRISVAD, J. C., Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Anal Bioanal Chem.** v.395, p.1225–1242, 2009.
- OKIGBO, R. N., Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**.159: 307–314, 2005.
- OKIGBO, R. N., Mycoflora of tuber surface of white yam (*Dioscorea rotundata*) and post harvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**, 156(2): 81–85, 2002.
- OKIGBO, R. N.; OSUINDE, M. I., Fungal leaf spot diseases of mango (*Mangifera indica*) in South Eastern Nigeria and biological control with *Bacillus subtilis*. **Plant protect. Sci.**, 39(2): 70–77, 2003.
- PAVITHRAN C.; MUKHERJEE P.S; BRAHMAKUMAR M, DAMODARAN A. D., Impact performance of sisal-polyester composites. **Journal of Materials Science Letters**. 7(8):825-826, 1988.
- PIZARRO, A. P. B.; OLIVEIRA FILHO, A. M.; PARENTE, J. P.; MELO, M. T.V.; SANTOS, C. E.; LIMA, P. R., O aproveitamento do resíduo da indústria do

- sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 32(1):23-29, 1999.
- PROSSIGA. **Panorama do Setor de Sisal no Estado da Bahia**. Disponível em: <<http://www.prossiga.br/arranjos/ba-sisal.html>> Acesso em: 07 de abril de 2007.
- ROMEIRO, R. S., **Preservação de Culturas de Bactérias Fitopatogênicas**. Mimeografado, Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Viçosa, MG. p.1, 1996.
- SÁ, J. O., **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma spp.*** Tese de mestrado. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Brasil, 2009.
- SILVA, O. R. R. F.; BELTRÃO, N. E. M., **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília: Embrapa SPI; Campina Grande: Embrapa CNPA, 205p, 1999.
- SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M.; 2006. **Embrapa Algodão**. Sistema de Produção N° 5. Disponível em < <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Sisal/CultivodoSisal/index.html> >, Acessado em 10 de Agosto de 2010.
- SILVA H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; CARRER FILHO, R.; PEREIRA, J. L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; MOUNTEER, A., Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**. 152: 371-375, 2004.
- SILVA, A. L. V.; OLIVEIRA, I. F.; COSTA, I. S.; ESTRELA, L., **APAEB: uma história de fibra, luta e subsistência**. Editora Feira de Santana, BA, Brasil, 1993.
- SOUZA FILHO, F. B.; SANTOS FILHO, H. P.; ROBBS, C. F., Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.5-10, 1979.
- SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M., A história. In: ANDRADE, W. (Ed.) **O Sisal do Brasil**. 1.ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.19-21, 2006.
- TEIXEIRA, P. J.; FERRAZ, M. M. G.; BROCCHI, M.; LEITE, D. S.; MONDEGO, J.M. C.; PEREIRA, G. A. G., Identificação de uma bactéria do gênero *Bacillus* com atividade antagonista ao fungo *Moniliophthora perniciosa* causador da vassoura de bruxa no cacauzeiro. **XI Congresso interno – Iniciação científica da UNICAMP**, 2008.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., **Microbiologia**. Tradução atual por Roberta Marchiori Martins, 8 edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- WAINWRIGHT, M., WICKRAMASINGHE, N., NARLIKAR, J., RAJARATNAM, P., AND PERKINS, J., Confirmation of the presence of viable but non-cultureable bacteria in the stratosphere, **Int. J. Astrobiology**, 30 3, 13–15, 2004.

WU, X.-Y.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J., Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, vol.64 , p.107–119, 2006.