

# Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Márcia Mikie Motoyama<sup>1</sup>, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada<sup>1</sup>, José Renato Stangarlin<sup>2</sup>, Ana Cristina Grade Fiori<sup>1</sup> e Carlos Alberto Scapim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Pernambuco 1777, C. P. 91, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência.

**RESUMO.** A utilização indiscriminada de agrotóxicos para o controle de doenças de culturas tem ocasionado problemas de contaminação humana e ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos químicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial de um extrato cítrico (produto comercial Ecolife<sup>40</sup>) na atividade antibacteriana. O produto foi testado nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 e 5000 ppm sobre as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* avaliando-se halo de inibição, densidade óptica e número de unidades formadoras de colônias. Através dos resultados obtidos verificou-se que o extrato cítrico apresentou atividade antibacteriana sendo dose-dependente. A concentração de 5000 ppm foi a mais eficiente.

**Palavras-chave:** antibacteriano, *Xanthomonas*, controle alternativo, extrato cítrico.

**ABSTRACT.** Antimicrobial effect by citric extract on *Ralstonia solanacearum* and on *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. The widespread application of agrototoxic to control crop diseases has caused human and environmental contamination problems and also a selection of resistant pathogens to these chemical products. Thus, the aim of this work was, by means of citric extract, (Ecolife<sup>40</sup> commercial product), to assess the antibacterial activity. The effect of concentrations of 1, 10, 100, 1000 and 5000 ppm of citric extract was carried out on bacteria *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through observation of the following parameters: inhibition zone, optical density and colony-forming units. Through the obtained results, it was verified that citric extract showed antibacterial activities. The antibacterial activity was dosis-dependent, and it is more efficient at 5000 ppm.

**Key words:** antibacterial activity, *Xanthomonas*, alternative control, citric extract.

## Introdução

A redução da produção em uma lavoura pode ser ocasionada por diversos fatores. A ocorrência de doenças fúngicas, bacterianas, viróticas e nematoses é uma das principais causas, podendo levar à perda total de uma cultura, causando danos tanto na parte aérea quanto no sistema radicular. Segundo Lyon *et al.* (1995), a resistência genética é o método mais utilizado para a proteção de plantas contra patógenos. No entanto, nem todas as plantas são resistentes a doenças e nem todo material resistente é adaptado a diferentes regiões. Dessa forma, o uso de agrotóxicos no controle de doenças tem sido cada vez mais freqüente na agricultura. A adoção contínua do controle químico pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados (Ghini

e Kimati, 2000), além da contaminação de alimentos e do ambiente, intoxicação de homens e animais, ressurgimento de algumas pragas e outras, antes consideradas secundárias, tornando-se importantes (Burg e Mayer, 1998). Tais efeitos têm estimulado a busca por formas alternativas de controle de doenças de plantas (Nakasone *et al.*, 1999).

O controle alternativo de doenças pode ser realizado através do controle biológico e da indução de resistência pela utilização de moléculas ou substâncias elicitoras, podendo ser de origem abiótica ou biótica. Dentre estas últimas, pode-se citar o uso de extratos vegetais e de óleos essenciais (Stangarlin *et al.*, 1999). Diversos produtos naturais, entre os quais os extratos de plantas medicinais, têm mostrado a capacidade de controlar doenças em plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana direta

quanto indireta (Stangarlin et al., 1999; Fiori et al., 2000). Alguns produtos comerciais à base de extratos cítricos apresentam esse potencial, como é o caso do Ecolife e Kilol LDF 100, este último, um produto comercial para o controle de *Xanthomonas*, *Erwinia* e *Pseudomonas*. O Ecolife<sup>40</sup> é um produto comercial constituído por ácidos ascórbico, cítrico e láctico, flavonóides e fitoalexinas cítricas, segundo o boletim técnico Ecolife<sup>40</sup> e é utilizado como biofertilizante.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extrato cítrico (produto comercial Ecolife<sup>40</sup>) sobre as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*.

### Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As bactérias *R. solanacearum* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* foram obtidas junto ao Laboratório de Fitopatologia da Unioeste - "Campus" de Marechal Cândido Rondon, Estado do Paraná. O extrato cítrico foi utilizado nas concentrações de 0, 1, 10, 100, 1000 e 5000 ppm. Em todos os experimentos adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições. A análise do experimento foi descritiva.

### Antibiograma (método do disco de papel de filtro)

Aliquotas de 0,1mL de *R. solanacearum* e *X. axonopodis* pv. *manihotis* cultivadas, separadamente, por 24 horas em Nutriente Glucose (NG) foram transferidas para placas de Petri contendo o meio Nutriente-Glucose-Ágar (NGA). Em seguida, 4 discos esterilizados de papel de filtro (8mm de diâmetro) foram mergulhados nas concentrações do extrato cítrico (previamente esterilizado por filtração) e colocados equidistantes em placas contendo as bactérias, e estas, incubadas a 30°C em B.O.D., no escuro. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento. No tratamento-controle, os discos de papel foram umedecidos em água destilada esterilizada. A avaliação foi realizada após 24 horas, através da medição do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano (Mariano et al., 2000).

### Determinação da densidade óptica

Aliquotas de 0,1mL, obtidas a partir de suspensões contendo  $1 \times 10^7$  células/mL, com 24 horas de crescimento de cada uma das bactérias, foram transferidas para tubos contendo 10mL de NG com as diferentes concentrações do extrato cítrico. Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, a

transmitância foi determinada a 540nm (Urenha et al., 1994). A densidade óptica (DO) foi calculada conforme Larpent e Larpent-Gourgaud, (1975):  $DO = \log I_0/I$ , onde  $I_0$  e  $I$  correspondem às intensidades das luzes incidente e transmitida, respectivamente.

### Determinação das unidades formadoras de colônias (UFC)

Aliquotas de 0,1mL, de uma suspensão bacteriana ( $10^6$  células/mL), de cada uma das bactérias, com 24 horas de crescimento em NG, foram transferidas para placas de Petri com meio NGA, contendo as diferentes concentrações do extrato cítrico. As placas foram incubadas em BOD a 30°C por 24 horas, no escuro. No tratamento-controle as bactérias foram cultivadas em NGA. Foram realizadas 5 repetições por tratamento. Após esse período, foi avaliado o número de UFC/mL (Urenha et al., 1994).

### Resultados e discussão

#### Efeito do extrato cítrico na formação do halo de inibição

Na avaliação do halo de inibição, notou-se que houve inibição das bactérias em todas as concentrações testadas, como apresentado na Tabela 1. A bactéria *R. solanacearum* apresentou uma inibição crescente até a concentração de 100 ppm, seguida de uma redução no diâmetro do halo formado em 1000 ppm. A maior inibição ocorreu com a concentração de 5000 ppm. Em *X. axonopodis* pv. *manihotis* observou-se que a partir de 100 ppm houve um aumento na inibição da bactéria, chegando a ser até quatro vezes maior em 5000 ppm, quando comparado à concentração imediatamente inferior.

**Tabela 1.** Efeito de diferentes concentrações do extrato cítrico na inibição *in vitro* das bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Extrato cítrico (ppm)	Diâmetro médio do halo de inibição* (mm)	
	<i>R. solanacearum</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>
Controle <sup>1</sup>	0,0	0,0
1	1,5	1,4
10	2,8	1,4
100	3,1	2,3
1000	2,5	2,4
5000	6,9	8,2

<sup>1</sup> Controle representado pelo crescimento bacteriano em meio nutriente-glicose sem adição do extrato cítrico; \* média de 4 repetições

Há vários trabalhos que demonstram os efeitos antimicrobianos de extratos vegetais e de óleos essenciais em fitopatógenos. Vêras e Yuyama (2001) verificaram que houve a formação de halo de inibição em *R. solanacearum* raças 1 e 2 na diluição de 1:1 do óleo e do extrato de *Piper aduncum*. Pattnaik et

al.(1996) testaram o efeito de óleos essenciais através do método de difusão em disco de várias plantas, entre elas uma laranja (*Citrus aurantium*) e verificaram que todas as bactérias testadas foram sensíveis a *Cymbopogon flexuosus*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha piperita* e *C. aurantium*.

Padmavati *et al.* (1997) avaliaram a sensibilidade de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a certos flavonóides usando disco de papel. Os autores observaram que naringenina (primeiro intermediário da via de flavonóides) na concentração de 25µg/disco inibiu o crescimento de 6 estirpes de *Xanthomonas*. A sensibilidade a naringenina (flavone), dihidroquercetina (dihidroflavonol), kaempferol e quercetina (flavonols) foi significativamente variável entre os patógenos. A dihidroquercetina inibiu apenas duas estirpes e não teve efeito sobre as demais. Muitos destes componentes estão presentes na formulação do Ecolife<sup>40</sup>, o produto comercial utilizado neste trabalho.

#### Efeito do extrato cítrico na densidade óptica

Os resultados apresentados na Figura 1 permitem observar que o extrato cítrico proporcionou uma redução na concentração de células de *R. solanacearum*. A redução foi acentuada a partir de 100 ppm, chegando à totalidade em 5000 ppm.

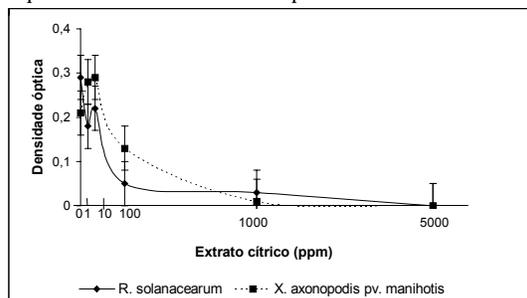
Em *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Figura 1) houve um aumento na densidade em 1 e 10 ppm, em relação à testemunha. Em 100 ppm a densidade diminuiu e em 1000 e 5000 ppm houve praticamente inibição total da bactéria. Foi avaliado também o pH do extrato cítrico nas diferentes concentrações a fim de se verificar sua influência nas bactérias testadas. Entretanto, observou-se que a máxima concentração testada (5000 ppm) tinha o pH 6,00, enquanto o controle apresentou pH 6,65. Assim, provavelmente o efeito do Ecolife ocorreu em função de sua composição e não proveniente de uma alteração no pH.

Em relação ao efeito do extrato cítrico na inibição de crescimento das bactérias e considerando-se que os componentes deste podem influenciar o desenvolvimento das mesmas, Lis-Balchin e Deans (1997) estudaram a atividade anti-*Listeria monocytogenes* com óleo essencial de várias plantas, inclusive *Citrus bergamia*, observando a efetividade dos óleos contra estirpes desta bactéria.

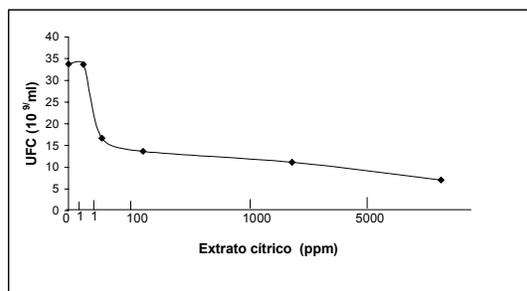
#### Efeito do extrato cítrico sobre Unidades Formadoras de Colônias

Os dados das Figuras 2 e 3 indicam que houve efeito inibitório do extrato cítrico em *R. solanacearum*

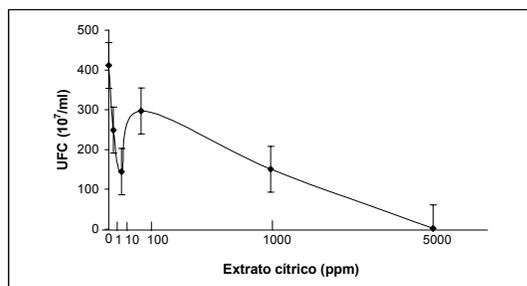
e *X. axonopodis* pv. *manihotis*. A partir de 10 ppm, houve uma diminuição no número de colônias formadas por *R. solanacearum*. Já para *X. axonopodis* pv. *manihotis*, houve uma redução na UFC em 1 e 10 ppm. Em 100 ppm houve um aumento no número de colônias formadas reduzindo novamente em 1000 ppm e 5000 ppm. Os comportamentos apresentados pelas bactérias foram semelhantes aos verificados no experimento de densidade óptica.



**Figura 1.** Efeito do extrato cítrico na densidade óptica de *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* após 24 horas de incubação. As barras representam o desvio padrão



**Figura 2.** Efeito do extrato cítrico sobre Unidades Formadoras de Colônias por *Ralstonia solanacearum*. As barras representam o desvio padrão



**Figura 3.** Efeito do extrato cítrico sobre as Unidades Formadoras de Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. As barras representam o desvio padrão

Caldana *et al.* (2001) avaliaram o efeito de micronutrientes no crescimento *in vitro* de *Xylella fastidiosa*. Observaram que não houve nenhum crescimento da bactéria nas concentrações mínimas

de 0,5mM, 0,05mM e 0,15mM de ácido bórico, sulfato de zinco e sulfato de cobre respectivamente. Dessa forma, pode sugerir que substâncias como flavonóides, ácidos ascórbico, cítrico e láctico, encontrados no extrato cítrico podem influenciar no desenvolvimento das bactérias.

### Referências

- BURG, I.C.; MAYER, P.H. Introdução. In: *Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças*, 1.ed. Francisco Beltrão: Grafitec, 1998. p.13.
- CALDANA, C. et al. Efeito de cobre, zinco e boro no crescimento de *Xylella fastidiosa* in vitro. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.26, p.297, 2001.
- FIORI, A.C.G. et al. Atividade de lecitinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.25, p.373, 2000.
- GHINI, R.; KIMATI, H. *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- LARPENT, J.P.; LARPENT-GOURGAUD, M. Estudo sobre crescimento bacteriano. In: *Microbiologia prática*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1975. cap. 3, p.69-71.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.82, p.759-762, 1997.
- LYON, G.D. et al. Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathol.*, Oxford, v.44, p.407-427, 1995.
- MARIANO, R.L.R. et al. Substâncias químicas para o controle de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Ed.). *Manual de práticas em Fitobacteriologia*. Recife: UFRPE, 2000, cap.10, p.111-112.
- NAKASONE, A.K. et al. Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v.25, n.4. p.331, 1999.
- PADMAVATI, M. et al. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, Oxford, v.46, n.3, p.499-502, 1997.
- PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, Cambridge, v.86, p.237-246, 1996.
- STANGARLIN, J.R. et al. Plantas Medicinais. *Biotechnology: Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v.2, n.11, p.16-24. 1999.
- URENHA, L.C. et al. Produção de biomassa celular de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. *Manual de métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola*. Brasília-DF: Embrapa, 1994, cap.4, p.104-106.
- VÉRAS, S.M.; YUYAMA, K. Atividade antagônica "in vitro" do óleo essencial e extrato de pimenta longa (*Piper aduncum*), no crescimento de *Ralstonia solanacearum* Raças 1 e 2. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v.26. p.274, 2001.

Received on February 10, 2003.

Accepted on August 25, 2003.