

NOTAS CIENTÍFICAS

Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas⁽¹⁾

Antonio Carlos Maringoni⁽²⁾ e Chukichi Kurozawa⁽³⁾

Resumo – Este trabalho objetivou avaliar a produção e a sensibilidade à bacteriocinas, de 17 isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Doze isolados foram procedentes do Estado de São Paulo e cinco de coleções internacionais. Apenas nove isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foram bacteriocinogênicos, e os 17 isolados avaliados foram separados em 12 grupos, conforme a sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos isolados bacteriocinogênicos.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, bactéria, cultura microbiana, bactericida.

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* typification by bacteriocin

Abstract – The objective of this work was to evaluate the production and sensitivity of seventeen isolates of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* to the bacteriocin. Twelve isolates were collected in the State of São Paulo, Brazil, and five were originated from international collection. Only nine isolates of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* were bacteriocinogenic and the seventeen isolates analyzed have been separated in twelve groups according to the sensitivity to bacteriocins produced by bacteriocinogenic isolates.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, bacteria, microbial culture, bactericides.

A maioria das espécies bacterianas, em mais de 30 gêneros, incluindo muitos patógenos de plantas, têm-se mostrado como produtores de substâncias antagonísticas às bactérias relacionadas (Vidaver, 1983). Segundo Nomura (1967) e Echandi & Moyer (1979), as bacteriocinas podem ser consideradas substâncias bactericidas, antibióticos de natureza protéica, altamente específicos, não multiplicáveis, sintetizadas por alguns isolados de bactérias contra isolados da mesma espécie ou de raças estritamente relacionadas. Com relação à produção de bacteriocinas por bactérias fitopatogênicas, muitos traba-

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 27 de fevereiro de 2002.

⁽²⁾ Universidade Estadual Paulista (Unesp), Fac. de Ciências Agrônômicas, Dep. de Produção Vegetal, Caixa Postal 237, CEP 18603-970 Botucatu, SP. Bolsista do CNPq. E-mail: maringoni@fca.unesp.br

⁽³⁾ Unesp, Fac. de Ciências Agrônômicas, Dep. de Produção Vegetal. E-mail: kurozawa@fca.unesp.br

lhos comprovaram o fato em vários gêneros, espécies, subespécies e patovares (Kerr, 1974; Crowley & De Boer, 1980; Adhikari et al., 1994; Kaiuru, 1997).

Pesquisas com bactérias Gram-positivas do grupo corineforme foram desenvolvidas, visando caracterizar isolados ou comparar a sensibilidade de diferentes gêneros e espécies de bactérias às bacteriocinas produzidas por isolados, correlatos ou não. Echandi (1976), trabalhando com 96 isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, observou que 57% dos isolados produziram bacteriocinas, e que era possível reuni-los em quatro grupos principais. Esse autor constatou a presença de dois tipos de bacteriocinas: uma termoestável e resistente à tripsina, e outra, termoestável e sensível à tripsina. Kurozawa (1980) relatou que 23, dos 36 isolados de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* estudados, produziram bacteriocinas termoestáveis. Em função da sensibilidade às bacteriocinas produzidas por dez isolados de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, os 36 isolados foram reunidos em nove grupos.

Pesquisas realizadas por Gross & Vidaver (1979) mostraram a heterogeneidade de reação entre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), *Rhatayibacter tritici*, *R. rathayi* e *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*, não sendo possível diferenciá-los pela tipagem por bacteriocinas. Dos 14 isolados de Cff analisados, nove foram produtores de bacteriocinas e a sensibilidade entre os isolados foi muito variável. Dois tipos de bacteriocinas foram produzidas pelos isolados de Cff: uma termoestável e sensível à pronase, proteinase K e tripsina; e a outra, termolábil, sensível à pronase e proteinase K e insensível à tripsina. Isolados de Cff bacteriocinogênicos produziram bacteriocinas que inibiram isolados de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*, *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* e *C. flaccumfaciens* pv. *betae*. Por outro lado, alguns isolados de Cff foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* e *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar 17 isolados de Cff, 12 procedentes do Estado de São Paulo e cinco de coleções internacionais, quanto à produção e a sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos isolados em estudo.

Para verificar a produção de bacteriocina pelos isolados de Cff, foram utilizadas as técnicas descritas por Kurozawa (1980) e Chiavegato (1988). Inicialmente, os isolados de Cff, relacionados na Tabela 1, foram repicados em 5 mL de caldo nutriente, incubados por 24 horas a 28°C, repicados em tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado e incubados durante 72 horas a 28°C. A seguir, procedeu-se à transferência de cada isolado bacteriano mediante um repicador, contendo nove discos de feltro de 4 mm de diâmetro, adaptado de Kurozawa (1980), para placas matrizes de BDA. As placas de Petri com as bactérias foram incubadas durante 72 horas a 28°C. Após o crescimento das colônias de Cff nas placas de Petri matrizes, estas foram transferidas com o repicador contendo discos de feltro para novas placas de Petri contendo meio BDA e incubadas durante 72 horas a 25°C. Foram repicadas placas de Petri suficientes para obter todas as combinações entre os isolados de Cff.

Tabela 1. Relação e características de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* de diferentes cultivares de feijoeiro.

Isolado	Ano de isolamento	Cultivar de feijoeiro	Local	Cor da colônia ⁽¹⁾	Instituição de origem
Feij - 2498	1995	Cartoca	Itaporanga/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2502	1995	Cartoca	Itaporanga/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2624	1996	Pérola	Itai/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2625	1996	Pérola	Itapeva/SP	Salmão	FCA/Unesp
Feij - 2626	1996	Cartoca	Itapeva/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2628	1996	Pérola	Itapeva/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2634	1996	Cartoca	Paranapanema/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2648	1997	- ⁽²⁾	Paranapanema/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2716	1997	Pérola	Salmão	Salmão	FCA/Unesp
Feij - 2718	1997	Cartoca	Cel. Macedo/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2720	1997	Campeão 3	Cel. Macedo/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2721	1997	Campeão 3	Cel. Macedo/SP	Amarela	FCA/Unesp
Feij - 2769 (CV9-SBR)	-	-	-	Amarela	The University of Nebraska/U.S.A.
Feij - 2771 (NCPP 559)	-	-	-	Amarela	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria/U.K.
Feij - 2772 (NCPPB 1446)	-	-	-	Amarela	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria/U.K.
Feij - 2773 (INRA 1379)	-	-	-	Amarela	INRA/France
Feij - 2774 (IBSBF 681/NCPPB 567)	-	-	-	Amarela	Instituto Biológico

⁽¹⁾Méio de cultura nutriente-sacarose-água. ⁽²⁾Cultivar não identificada.

Após a incubação, as placas de Petri foram transferidas, na posição invertida, para capela de exaustão e adicionados 1,5 mL de clorofórmio na tampa de cada placa. As colônias bacterianas foram expostas durante 1 hora ao vapor de clorofórmio, para a inativação, e imediatamente transferidas para câmara asséptica de fluxo contínuo de ar, com as tampas entreabertas, durante 1 hora, visando à evaporação do clorofórmio remanescente.

Sobre a superfície do meio de cultura contendo as bactérias inativadas, foram vertidos 4,5 mL de meio de BDA semi-sólido fundente (meio de BDA contendo 5 g/L de ágar bacteriológico), a 45°C, acrescido de 0,5 mL de suspensão bacteriana de cada um dos isolados de Cff, previamente cultivados em caldo nutritivo (24 horas/28°C).

Após a solidificação do meio BDA fundente sobre a superfície do meio de cultura, as placas de Petri foram incubadas durante 72 horas a 25°C, e os halos de inibição formados ao redor das colônias foram avaliados qualitativamente. Assim, cada isolado de Cff foi avaliado como produtor de bacteriocina contra todos os isolados. Foram instalados dois experimentos para agrupar os isolados bacteriocinogênicos. Os isolados foram considerados produtores de bacteriocina quando houve a formação de halo de inibição maior ou igual a 1 mm.

Dos 17 isolados de Cff, nove, aproximadamente 53%, foram bacteriocinogênicos, e oito não produziram bacteriocinas (Tabela 2). A quantidade de isolados bacteriocinogênicos, observados no presente estudo, concorda com os relatos de Echandi (1976) e Kurozawa (1980), para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, de Crowley & De Boer (1980), para *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, de Adhikari et al. (1994), para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, de Chiavegato (1988), para *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e de Gross & Vidaver (1979), para Cff.

Os isolados de Cff foram agrupados em 12 grupos distintos, sendo que 11 apresentaram um isolado por grupo e apenas um (grupo 6) apresentou seis isolados (Tabela 2). Pelo menos 16 isolados de Cff foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por, no mínimo, um dos isolados bacteriocinogênicos, e apenas o isolado Feij - 2625 não foi sensível às bacteriocinas produzidas pelos isolados bacteriocinogênicos. Os isolados Feij - 2624, Feij - 2628 e Feij - 2769 produziram bacteriocinas que inibiram um maior número de isolados. Com base no trabalho de Gross et al. (1979), as bacteriocinas produzidas por Cff foram denominadas “flaccumfacin”.

A sensibilidade dos isolados de Cff às bacteriocinas foi muito variável, fato também observado por Gross & Vidaver (1979). Dos isolados de Cff provenientes de coleções internacionais, dois foram bacteriocinogênicos (Feij - 2769 e Feij - 2771) e, pelo menos, dez isolados nacionais de Cff foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por um desses isolados e os cinco isolados de coleções internacionais foram sensíveis, no mínimo, à bacteriocina produzida por um dos isolados brasileiros (Tabela 2).

Conforme Chiavegato (1988), diferenças na capacidade de produção e sensibilidade à bacteriocinas entre isolados bacterianos de uma mesma espécie ou entre espécies relacionadas têm possibilitado a classificação infra-subespecífica e, embora a produção de bacteriocinas seja geneticamen-

te estável, pode ser alterada sob determinadas condições, e sua utilização prática, quer na diferenciação de espécies, quer em estudos epidemiológicos, requer melhor caracterização.

Segundo Lwoff (1953), uma partícula de bacteriocina é suficiente para matar uma célula bacteriana sensível. Com base nesta informação, Becker (1980), Kurozawa (1980) e Chiavegato (1988) sugeriram a possibilidade de que, quando se infectam plantas com uma mistura de isolados, os isolados que possuem ação bacteriocinogênica causariam morte de células bacterianas sensíveis, e isso iria alterar a quantidade de inóculo viável empregada nas inoculações e, conseqüentemente, alterar também os resultados das inoculações. Visto que há isolados de Cff tanto bacteriocinogênicos como sensíveis às bacteriocinas, conforme os resultados apresentados neste trabalho, bem como nos relatos de Gross & Vidaver (1979), este problema também poderá ocorrer quando se emprega mistura de isolados em inoculações, sem o conhecimento prévio da produção de bacteriocinas e da sensibilidade desses isolados às bacteriocinas produzidas por outros isolados.

Houve variabilidade entre os isolados de Cff quanto à produção de bacteriocinas, e os isolados de Cff foram separados em 12 grupos, conforme a sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos isolados bacteriocinogênicos.

Referências

- ADHIKARI, T. B.; MEW, T. W.; TENG, P. S. Phenotypic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 1, p. 68-72, 1994.
- BECKER, W. F. **Atividade bacteriocinogênica, resistência a antibióticos e métodos rápidos para determinação de patogenicidade em *Pseudomonas glycinea* Coerper**. 1980. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- CHIAVEGATO, E. J. **Produção de bacteriocinas por diferentes isolados e raças fisiológicas de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E. F. Smith, 1901) Dye, 1978**. 1988. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- CROWLEY, C. F.; DE BOER, S. H. Sensitivity of some *Erwinia carotovora* serogroups to macromolecular bacteriocins. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 26, n. 9, p. 1023-1028, 1980.
- ECHANDI, E. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 66, n. 4, p. 430-432, 1976.
- ECHANDI, E.; MOYER, J. W. Production, properties and morphology of bacteriocins from *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, p. 1204-1207, 1979.
- GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 25, p. 367-374, 1979.
- GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K.; KERLIS, M. B. Indigenous plasmids from phytopathogenic *Corynebacterium* species. **Journal of General Microbiology**, London, v. 115, p. 479-489, 1979.

KAIURU, G. M. Biochemical and pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p. 239-246, 1997.

KERR, A. Soil microbiological studies on *Agrobacterium radiobacter* and biological control of crown gall. **Soil Science**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 168-172, 1974.

KUROZAWA, C. **Caracterização de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen através de sorologia e sensibilidade a bacteriófagos, a drogas e a bacteriocinas**. 1980. 61 f. Tese (Livre-docência) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LWOFF, A. Lysogeny. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 17, p. 269-337, 1953.

NOMURA, M. Colicins and related bacteriocins. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 21, p. 257-284, 1967.

VIDAVER, A. K. Bacteriocins: the lure and the reality. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 5, p. 471-475, 1983.