

T O M O M A S A Y A N O

- Bolsista da FAPESP -

ESTUDO BACTERIOLÓGICO E SOROLÓGICO DE ALGUMAS
AMOSTRAS PERTENCENTES A VÁRIOS PATOTIPOS DE
Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson.

Tese de Mestrado apresentada ao Insti
tituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.

Orientador: Prof.Dr. A.F.P. Castro.

Departamento de Microbiologia e Imunologia
da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas - São Paulo

1976

Aos

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro e
Dr. Takao Namekata

exemplos de pesquisadores, que pela sua
amizade, orientação e incansável dedica
ção serviram de estímulo para a realiza
ção deste trabalho.

À minha família

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

P R E F Á C I O

O elevado número de hospedeiros, dos quais se tem isolado amostras do gênero *Xanthomonas*, responsáveis por várias moléstias em plantas de interesse econômico e a dificuldade em se classificar estes microrganismos dentro de uma espécie, utilizando outro critério que não a patogenicidade para hospedeiros, despertaram a nossa atenção no sentido de averiguar algumas características deste gênero que ainda não haviam sido exploradas.

Revedo-se a literatura, verifica-se que as propriedades bioquímicas das bactérias do gênero *Xanthomonas* são mais ou menos homogêneas, não permitindo, na maior parte das vezes, uma diferenciação absoluta. Os poucos estudos sorológicos realizados não parecem ter levado a uma padronização de técnicas aplicáveis a estes casos.

Diante destas observações iniciais, nos propusemos a rever as propriedades bioquímicas de alguns patotipos do gênero *Xanthomonas*, bem como estudar suas propriedades sorológicas, sensibilidade a drogas e produção de bacteriocinas.

Longe de se constituir num trabalho completo e exaustivo, esperamos, contudo, que as informações aqui contidas possam ser de real utilidade para estudos que venham a ser feitos sobre essas bactérias, bem como das moléstias por elas causadas.

É com satisfação que apresentamos nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que tornaram possível a realização do presente trabalho.

Aos Profs. Drs. Humberto de Araújo Rangel e Irineu José Barsanti de Camargo, pela orientação, estímulo e total apoio recebidos na aprendizagem científica.

Aos Dr. Mario Barreto Figueredo do Instituto Biológico e Profa. Dra. Marlene Braide Serafim da Universidade Estadual de Campinas, pelas valiosas sugestões e críticas construtivas.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus professores, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo excepcional apoio prestado no desenvolvimento da pesquisa e do ensino pós-graduado.

Ao Prof. Dr. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelos incentivos ao desenvolvimento das atividades do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP -, pela concessão de Bolsa de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq -, pela concessão de Bolsa de Aperfeiçoamento na fase inicial deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Osamu Kimura, Fujio Akiba, Charles Frederick Robbs, do Departamento de Fitopatologia da

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Dr. Osvaldo Paradela Filho, chefe da Seção de Microbiologia Fito-totécnica do Instituto Agronômico de Campinas e ao engº agrº Julio Rodrigues Neto, da Seção de Bacteriologia Fito-patológica do Instituto Biológico, pelo fornecimento das bactérias e sugestões valiosas.

Ao Sr. Brasília S. Oliveira, Seção de Meio de Cultura do Instituto Biológico, São Paulo, pelo fornecimento dos meios de cultura para testes bioquímicos.

Aos colegas Angela Cristina Rodrigues, Margaretti Simões e Geneci Fernandes Davi, pela colaboração prestada na execução deste trabalho.

À Srta. Elisabeth Aockio, pela ajuda prestada na datilografia deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, pela amizade e constantes incentivos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas que colaboraram neste trabalho.

Agradecemos às seguintes Instituições pelos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Estadual de Campinas:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia).

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA.

Durante o desenvolvimento deste trabalho o autor foi bolsista do CNPq (na fase inicial) e da FAPESP. O autor e os orientadores, em particular, externam seus agradecimentos a estas Instituições.

C O N T E Ú D O

	Pág.
Abreviações adotadas	I
Relação das Tabelas	II
Figura	IV
Capítulo I - INTRODUÇÃO	1
Capítulo II - MATERIAL E MÉTODOS	13
Capítulo III - RESULTADOS	28
Capítulo IV - DISCUSSÃO	41
Capítulo V - RESUMO E CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. ABREVIACÕES ADOTADAS.

- ca - patotipo *campestris*.
ci - patotipo *citri*.
cu - patotipo *cucurbitae*.
di - patotipo *dieffenbachiae*.
es - patotipo *esculenti*.
he - patotipo *hederae*.
gl - patotipo *glycines*.
ma - patotipo *malvacearum*.
mi - patotipo *mangiferaeindicae*.
mh - patotipo *manihotis*.
ph - patotipo *phaseoli*.
ri - patotipo *ricini*.
ve - patotipo *vesicatoria*.
vi - patotipo *vitians*.
sp - bactéria isolada de soja perene.
BDA - Batata-Dextrose-Ágar.
DNase - Desoxirribonuclease.
nm - nanômetro (10^{-9} m).
O-F - Prova de Oxidação-Fermentação.
rpm - rotação por minuto.
µg/ml - micrograma por mililitro.

II. RELAÇÃO DAS TABELAS

Tabelas		Pág.
I	Principais patotipos de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson constatados entre nós, moléstias produzidas e seus hospedeiros originais.....	2
II	Relação dos patotipos e amostras de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson estudados. Dados sobre designação, hospedeiro e procedência.....	14
III	Relação das amostras de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson utilizadas como antígenos no preparo de anti-soros....	17
IV	Drogas empregadas e seus diluentes.....	24
V	Quantidade das soluções estoques e de meio de cultura para se obter a concentração desejada da droga.....	26
VI	Características bioquímicas das 31 amostras de 15 patotipos de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson.....	30
VII	Resultados dos testes de hemaglutinação passiva com 31 amostras de 15 patotipos de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson frente a 19 anti-soros preparados com amostras destes microrganismos.....	33

Tabelas	Pág.
VIII Distribuição das amostras de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson pertencentes a 9 sorotipos descritos pela técnica de hemaglutinação passiva.....	34
IX Relação das amostras de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson produtoras de bacteriocinas e das amostras sensíveis utilizadas como indicadoras.....	36
X Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) de Estreptomicina, Neomicina, Kanamicina, Gentamicina, Ampicilina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Polimixina e Sulfadiazina para 31 amostras pertencentes a 15 patotipos de <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson.....	39

III. Figura

Figura	Pág.
1 Produção de bacteriocinas pelas amostras gl-2209 (fig. 1a) e mi-2097(fig. 1b) ...	37

CAPÍTULO I

I N T R O D U Ç Ã O

As bactérias do gênero *Xanthomonas*, que por volta de 1971 já se encontravam distribuídas em mais de 120 "espécies" (18,36), são bastante comuns entre nós, ocorrendo em vários hospedeiros de interesse e ocasionando, em decorrência das moléstias produzidas, sérios prejuízos econômicos.

Os principais representantes deste grupo que têm sido isolados entre nós, as moléstias produzidas e os respectivos hospedeiros estão relacionadas na Tabela I, adotando-se para os microrganismos a nomenclatura recomendada por DYE & LELLIOTT (18) e LELLIOTT (36).

Vários trabalhos já foram realizados sobre as características bioquímicas do gênero *Xanthomonas*, sendo poucos porém os estudos feitos sobre sorologia da bactéria. Como veremos a seguir, os resultados obtidos trouxeram pouca contribuição para a caracterização de diferentes "espécies" do gênero, além de apresentarem, por vezes, dados discordantes. Por outro lado, o microrganismo não tem sido investigado suficientemente quanto a certas propriedades, eventualmente úteis na sua caracterização.

1. Características bioquímicas: Segundo STARR (48) até a primeira metade deste século, as bacté-

T A B E L A I

Principais patótipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson
constatados entre nós, moléstias produzidas e seus hospedeiros
originais

Agente Etiológico (<i>X. campestris</i> f. sp.)	Moléstias	Hospedeiros
<i>campestris</i> (Pammel)	Podridão negra	Repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> Lour.)
<i>citri</i> Hasse	Cancro cítrico	Laranjeira (<i>Citrus</i> spp.)
<i>esculenti</i> Rangaswami & Eswaran	Mancha angular	Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentum</i> L.)
<i>glycines</i> Nakano	Pústula bacteriana	Soja (<i>Glycine max</i> Merrill)
<i>malvacearum</i> Erw. Smith	Mancha angular	Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)
<i>mangiferaeindicae</i> Patel et al.	Mancha bacteriana	Mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.)
<i>manihotis</i> Arthaud-Berthet & Bonder	Bacteriose	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)
<i>phaseoli</i> Smith	Crestamento	Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)
<i>ricini</i> Yoshi & Takimoto	Bacteriose	Mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.)
<i>vesicatoria</i> Doidge	Pústula bacteriana	Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)
<i>vitians</i> Brown	Pústula bacteriana	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)
	Murcha	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)

rias fitopatogênicas eram classificadas baseando-se principalmente na sintomatologia em hospedeiros. Este fato, bem como a falta de um estudo crítico-comparativo dos microrganismos pertencentes ao gênero *Xanthomonas* ocasionaram um aumento pronunciado do número de "espécies". Existem algumas listas de características bioquímicas e culturais (14,19,47), mas os dados nelas contidos são inconsistentes e levantaram muitas dúvidas a respeito da sua validade.

Embora algumas das discordâncias observadas possam ser consequência de variações que normalmente ocorrem entre as amostras, outras poderiam ser decorrentes dos métodos utilizados para realização das provas bioquímicas. Conforme cita DYE (16), algumas destas diferenças mencionadas eram tão profundas que por si só já seriam suficiente para mudar a posição sistemática do gênero estudado, isto é, aeróbios e anaeróbios facultativos estavam sendo analisados, por alguns desses autores, sob a denominação comum de *Xanthomonas*. Este mesmo autor comenta, muito oportunamente, sobre a tendência de alguns pesquisadores (3,26,50,51) em incluir no gênero *Xanthomonas* bactérias isoladas do solo, que satisfizessem as características gerais do gênero *Xanthomonas*, aumentando pois consideravelmente o número de microrganismos dentro do gênero.

Um dos trabalhos mais completos sobre as características bioquímicas do gênero *Xanthomonas* foi realiza-

do por DYE (16) que comparando 209 culturas de *Xanthomonas* compreendendo 57 "espécies" até então reconhecidas, chegou à conclusão de que as mesmas não poderiam ser diferenciadas por qualquer dos 30 testes por ele utilizados. Segundo ele, essas bactérias formavam um grupo homogêneo, que poderia entretanto ser facilmente separados de outros microrganismos, também produtores de pigmentos amarelos, que foram incluídos em seus estudos para fins comparativos.

Embora os trabalhos de DYE (16,17) tenham desfeito, pelo menos nas amostras por ele estudadas, quaisquer dúvidas quanto à homogeneidade de comportamento bioquímico de amostras do gênero *Xanthomonas*, resolvemos repetir parcialmente os estudos daquele autor trabalhando com amostras isoladas no Brasil e incluindo em nosso estudo algumas provas não estudadas por ele, tais como hidrólise de Tween 80, utilização de gluconato e malonato, produção de caseinase e fenilalaninadeaminase

HAYWARD (25), em 1966, concorda com DYE (16,17) sobre a dificuldade em se fazer uma diferenciação de "espécies" com base unicamente na fisiologia do patógeno. Segundo suas próprias palavras, é usualmente impossível identificar uma "espécie" do gênero *Xanthomonas* quando se desconhece o hospedeiro de origem. Este mesmo autor, entretanto, a despeito dos trabalhos de DYE (16,17), ainda opina favoravelmente sobre a realização de alguns testes, tais como hidrólise de amido e de Tween 80, produção de

caseinase e gelatinase, na caracterização de uma mesma "espécie" de *Xanthomonas* isolada de hospedeiros diferentes ou eventualmente na caracterização de uma "espécie".

Em virtude destas considerações sobre a dificuldade de se utilizar propriedades fisiológicas para a classificação do microrganismo e baseando-se nos trabalhos de DE LEY & FRIEDMANN (10) e DE LEY et al (11), que verificaram um alto grau de hibridização de DNA entre 28 "espécies" do gênero *Xanthomonas*, LELLIOTT (36), em 1971, e DYE & LELLIOTT (18), em 1974, propuseram a criação de dois grupos de *Xanthomonas*. Um desses grupos, bastante homogêneo, seria representado por todas aquelas amostras do gênero *Xanthomonas* ditas típicas e, que apresentassem crescimento em ágar simples caracterizado pela presença de colônias elevadas, mucóides e com pigmento amarelo característico do gênero (49). Segundo esses autores todas essas amostras seriam agrupadas, em virtude de sua semelhança, em uma única espécie - *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson - considerando-se todas as "espécies" deste grupo anteriormente descritas como seus patotipos.

Em decorrência destas observações, LAPAGE et al. (34) numa revisão de Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias, manteve a espécie *X. campestris*, propondo que a indicação sobre patotipo viesse colocada em seguida, isto é, exemplificando, *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson f.sp. *vesicatoria* Doidge.

Assim sendo, no presente trabalho, usaremos es-

te tipo de nomenclatura que já havia sido, aliás, adotada por KIMURA et al. (31) e ROBBS et al. (44).

Outro grupo de bactérias do gênero *Xanthomonas*, não incluído no presente trabalho, seria composto pelas seguintes espécies: *X. albilineans* (Ashby) Dowson; *X. ampelina* Panagopoulos; *X. axonopodis* Starr & Garces e *X. fragariae* Kennedy & King. Estas podem ser facilmente distinguíveis entre si e das amostras de *X. campestris* através de provas bioquímicas (18).

2. Características sorológicas: o primeiro trabalho sobre aplicação da sorologia na classificação de microrganismos do gênero *Xanthomonas* se deve a St. JOHN-BROOKS et al. (45). Utilizando a prova de soro-aglutinação, verificaram esses autores, ao examinarem pequeno número de amostras, que entre 3 isolados de *X. campestris* dois eram sorologicamente relacionados. Duas amostras de *X. campestris* f.sp. *malvacearum* mostraram-se idênticas em provas de aglutinação cruzada. Afirmaram ainda existir uma relação sorológica estreita entre os microrganismos acima citados e os patotipos *pelargonii*, *phaseoli* e *vitians*. Por outro lado, os patotipos *hyacinthi*, *pruni* e *stewartii* não tinham qualquer relação sorológica com os patotipos anteriormente mencionados.

Surgiram posteriormente mais alguns trabalhos (27,37,47,53) utilizando também testes de aglutinação, com a finalidade de classificar os microrganismos em ques

tão. Infelizmente todos esses autores trabalharam com poucos patotipos e de modo geral os resultados obtidos não trouxeram contribuições importantes.

Os trabalhos mais completos sobre a sorologia do gênero *Xanthomonas* são devidos a ELROD & BRAUN (20,21,22). Trabalharam esses autores com 36 patotipos de *Xanthomonas campestris* que na época constituíam, segundo a nomenclatura empregada, "espécies" distintas. Relataram esses pesquisadores a existência de 5 grupos imunológicos: *campestris*, *phaseoli*, *pruni*, *translucens* e *vascularum*. Entretanto, algumas reações cruzadas entre representantes destes grupos não permitiram uma delimitação precisa e absoluta dos mesmos. Assim sendo, verificaram que o patotipo *pruni* apresentava reação cruzada com alguns representantes do grupo do patotipo *translucens*. Idênticas observações foram demonstradas para representantes dos outros três grupos mencionados. Utilizando provas de absorção de aglutininas, verificaram que esses grupos sorológicos poderiam ser divididos em vários subgrupos, alguns compostos de dois a quatro representantes, como no caso do patotipo *translucens*. Outros, como ocorreu com o patotipo *vascularum*, apresentaram grande número de antígenos em comum entre os representantes do grupo, não permitindo a obtenção de soros específicos que pudessem caracterizar a existência de subgrupos bem definidos.

Apesar do exaustivo trabalho levado a efeito por esses autores, a complexidade dos resultados obtidos fez

com que não se tornasse possível a utilização na prática dos métodos por eles recomendados.

A utilização de outras provas sorológicas com a finalidade de classificar microrganismos do gênero *Xanthomonas* são encontradas nos trabalhos de LOVREKOVICH & KLEMENT (38) e de MORTON et al. (39). Observaram esses autores que, através de provas de dupla difusão em gel de ágar, era possível diferenciar amostras do patotipo *vesicatoria* isoladas de tomateiro e de pimentão.

CHARUDATTAN et al. (7), trabalhando com 72 isolados do patotipo *vesicatoria* e utilizando também a prova de dupla difusão em gel de ágar, relataram a existência de dois tipos sorológicos, não evidenciando porém nenhuma relação entre tipo sorológico e hospedeiro, isto é, os tipos 1 e 2 ocorriam tanto nas amostras isoladas de pimentão como nas amostras isoladas de tomateiro.

Uma das provas que tem sido largamente utilizada na classificação sorológica de microrganismos de interesse médico e veterinário é a chamada hemaglutinação indireta ou passiva. Entre microrganismos que têm sido estudados por esta técnica destacam-se: *Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pasteurella tularensis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. Em todos esses casos, os antígenos sensibilizadores das hemácias, utilizadas no teste de hemagluti-

nação indireta, eram de natureza polissacarídica. Em algumas oportunidades a contribuição trazida por esta metodologia foi fundamental para a classificação de certos microrganismos como acontece por exemplo com *Pasteurella multocida* (42,43) e com *Corynebacterium equi*, para citar alguns exemplos mais importantes.

Não encontramos na literatura consultada qualquer referência sobre a utilização da técnica de hemaglutinação indireta para a classificação de microrganismos fitopatogênicos.

3. Produção de bacteriocinas: em 1925, GRATIA, na Bélgica, descobriu que filtrados de uma determinada amostra de *Escherichia coli* inibiam o crescimento de outras amostras da mesma espécie. Essa substância, que mostrou ser letal para amostras sensíveis, foi denominada colicina. Estudos posteriores demonstraram a existência de várias colicinas que podiam ser distinguidas pela sua atividade letal para determinado número de amostras sensíveis. Cada uma dessas colicinas foi identificada por uma letra do alfabeto (9,30).

Substâncias semelhantes têm sido isoladas para amostras do gênero *Pseudomonas* (piocinas) e para *Bacillus megaterium* (megacinas), existindo evidências de que possam ocorrer indiscriminadamente em qualquer microrganismo. Por este motivo, adotou-se a denominação genérica de bacteriocinas para as substâncias com estas características.

produzidas por bactérias (9,29).

Sabe-se hoje que a produção de bacteriocinas é condicionada à existência de um plasmídeo na célula bacteriana (29,30).

Numerosos pesquisadores têm utilizado a produção de bacteriocinas a fim de obter melhores informações, geralmente para fins epidemiológicos em microrganismos onde as provas bioquímicas ou sorológicas não são suficientes para caracterizar bactérias de mesmo biotipo e sorotipo isoladas de diferentes fontes de infecção. Assim sendo, à semelhança do que se faz com fagotipagem, o processo tem sido usado na tipificação de amostras de *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*, além de *Pseudomonas* spp. (30).

Segundo HARTING et al. (29), na elaboração de um esquema de classificação baseado na produção de bacteriocinas é importante lembrar que o espectro de atividade de uma bacteriocina é constante, independentemente da amostra que a produziu.

Não encontramos na literatura qualquer indicação sobre a utilização da produção de bacteriocinas, na tipificação de bactérias fitopatogênicas, com o objetivo de obter informações mais detalhadas sobre patótipos idênticos mas de diferentes procedências.

4. Sensibilidade a drogas: nas bactérias de interesse médico e veterinário, a obtenção de dados referentes à sensibilidade ou à resistência a diferentes drogas,

sejam antibióticos ou quimioterápicos, tem uma série de finalidades e aplicações. A primeira delas, que evidentemente não é aplicável ao nosso caso, diz respeito ao tratamento de enfermidades bacterianas. A adição de antibióticos a meios de cultura tem sido usada para o isolamento de bactérias resistentes aos mesmos, possibilitando assim um controle da flora contaminante que geralmente acompanha o material examinado. Um exemplo desta aplicação é o meio de WOOD (5) contendo kanamicina, para o isolamento de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. O comportamento de uma determinada bactéria frente a antibióticos pode se constituir por vezes num excelente dado complementar para a caracterização da mesma. É o caso por exemplo, das amostras de *Streptococcus pyogenes* do grupo A, que são sensíveis à bacitracina (30) ou de amostras de micobactérias oportunistas, do grupo III de Runyon, que podem ser parcialmente distinguidas pelo modelo de resistência as drogas tuberculostáticas (6).

A presença de plasmídeos portadores de fatores R, em bactérias gram negativas, condiciona a ocorrência de resistência múltipla a antibióticos e quimioterápicos, geralmente em altos níveis. A par da utilidade em saúde pública, para bactérias de interesse médico, de modo geral, em bacteriologia, o conhecimento sobre a existência ou não de fatores R permite o seu estudo sob o ponto de vista genético, isto é, transferência desses fatores para outras bactérias e análise da compatibilidade destes mes-

mos fatores com outros plasmídeos, eventualmente existentes nas bactérias estudadas.

Exceção feita ao trabalho de PEREIRA (41) que utilizando discos de antibióticos, determinou a resistência de amostras de *Xanthomonas campestris* f.sp. *passiflora* a várias drogas, não encontramos na literatura indicação de que a prova de sensibilidade a drogas tenha sido utilizada em relação a bactérias deste gênero, fato este que nos foi confirmado por AZEVEDO, J.L.; PARADELA, O e ROBBS, C.F. (*).

A inclusão deste estudo em nosso trabalho visou principalmente verificar se, através do conhecimento do modelo de resistência da bactéria, seria possível idealizar meios seletivos ou métodos de identificação para microrganismos do gênero *Xanthomonas*.

(*) Comunicação Pessoal.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras.

Foram estudadas 31 amostras de *Xanthomonas campestris* compreendendo um total de 15 patotipos diferentes. Todas estas amostras foram isoladas por outros pesquisadores, a partir de lesões típicas que ocorrem em moléstias causadas por esta bactéria e observadas em algumas de nossas principais culturas de interesse econômico.

As amostras estudadas e os dados sobre origem, designação, hospedeiro e procedência se encontram na Tabela II.

Até a presente data e durante o período de realização deste trabalho, compreendido entre novembro de 1973 e junho de 1976, as amostras foram repicadas cada 15 dias, em tubos contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar, BDA (Difco).

2. Determinação das características bioquímicas.

Foram utilizadas as seguintes provas: citocromoxidase, catalase, hidrólise do amido, oxidação de carboidratos e poliálcoois, produção de H₂S, indol, urease, gelatinase, caseinase, fenilalaninadeaminase, tirosinase e utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio. Foram ainda estudadas a produção de lecitinase

TABELA II

Relação dos patotipos e amostras de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson estudados. Dados sobre designação, hospedeiro e procedência

Patotipos de <i>X. campestris</i> f.sp.	Designação	Hospedeiro	Procedência
<i>campestris</i> Pammel)	IB-134	Repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> Lour.)	São Roque, SP.
	ENA-903	Mostarda negra (<i>Brassica nigra</i> Koch.)	Bangu, RJ.
	IB-s/n	Repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> Lour.)	Mogi das Cruzes, SP.
<i>citri</i> Hasse	IB-130	Limoeiro galego (<i>Citrus aurantifolia</i> Swingle).	Maringá, PR.
	IB-s/n	Laranjeira (<i>Citrus</i> sp.)	Dourados, MF.
<i>cucurbitae</i> Bryan	ENA-2173	Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	Presidente Prudente, SP.
	IB-s/n	Abóbora (<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne)	Atibaia, SP.
<i>dieffenbachiae</i> McCulloch & Pirone	IB-140	Antúrio (<i>Anthurium</i> sp.)	Registro, SP.
<i>esculenti</i> Rangaswami & Eswaran	ENA-568	Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentum</i> L.)	Santa Cruz, RJ.
<i>glycines</i> Nakano	ENA-2076	Soja (<i>Glycine max</i> Mer.)	Uberlândia, MG.
	ENA-2209	Soja (<i>Glycine max</i> Mer.)	Itaguaí, RJ.
<i>hederae</i> Arnaud	ENA-2170	Hera (<i>hedera helix</i> L.)	Poços de Caldas, MG.
<i>malvacearum</i> Erw. Smith	IAC-1772	Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Campinas, SP.
	ENA-2216	Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Campinas, SP.
<i>manihotis</i> Arthaud-Berthet & Bondar	ENA-975	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	Itaguaí, RJ.
<i>mangiferaeindicae</i> Patel et al.	ENA-2097	Mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.)	Guaratiba, RJ.
<i>phaseoli</i> Smith	ENA-2099	Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Papucaia, SP.
<i>ricini</i> Yoshi & Takimoto	IB-113	Mamoneiro (<i>Ricinus communis</i> L.)	Fernandópolis, SP.
	ENA-779	Mamoneiro (<i>Ricinus communis</i> L.)	Urca, RJ.
<i>vesicatoria</i> Doidge	ENA-76	Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Campinas, SP.
	ENA-734	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	São Carlos, SP.
	ENA-791	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Flórida, EUA.
	ENA-792	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Flórida, EUA.
	ENA-793	Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	Flórida, EUA.
	ENA-804	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Tinguá, RJ.
	ENA-818	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Campinas, SP.
	ENA-833	Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Piranema, SP.
	ENA-2201	Beringela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Itapecerica da Serra, SP.
<i>vitians</i> Brown	ENA-2008	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Itaguaí, RJ.
	ENA-2009	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Atibaia, SP.
sp.	IB-s/n	Soja perene (<i>Glycine wightii</i> Verde)	Campinas, SP.

e "pearly layer", hidrólise de Tween 80 e DNase.

A produção de citocromoxidase foi verificada pelo método de KOVACS (33) e a prova de oxidação-fermentação (O-F) conforme recomendado por HUGH & LEIFSON (28).

Para a pesquisa da produção de nitrito a partir de nitrato, preparamos o meio descrito por DYE (16). Após a semeadura das amostras em estudo e incubação por 48 a 72 horas, adicionavam-se uma a duas gotas de HCl concentrado e em seguida uma solução de bicloridrato de N(1-naftil) etileno diamina. O aparecimento de uma cor púrpura indicava uma reação positiva. Nas provas negativas adicionou-se sempre zinco metálico, a fim de confirmar ou não a negatividade destas reações. Foram igualmente estudadas por métodos descritos por DYE (16) a produção de H₂S e a utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio.

Para a verificação da atividade oxidativa sobre carboidratos e poliálcoois, foi utilizado como meio de cultura básico aquele descrito por DYE (16), ao qual se adicionou como indicador púrpura de bromocresol, na concentração de 0,02% e 0,5% das seguintes fontes de carbono: adonitol, α metil D glicose, amido, arabinose, celobiose, dextrina, dulcitol, frutose, galactose, glicerol, glicose, inositol, inulina, lactose, maltose, manitol, manose, melebiose, melezitose, rafinose, ramnose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose e xilose. Os testes foram considerados positivos quando, dentro do espaço de 15 dias, se verificava uma alteração da cor violeta-claro pa

ra amarelo.

Para a verificação da oxidação do gluconato, utilização do malonato, hidrólise do amido, produção de indol, urease, gelatinase, caseinase, fenilalaninadeaminase, tirosinase, lecitinase e "pearly layer", foram utilizados meios e técnicas recomendados por COWAN & STEEL (8).

Na prova de hidrólise do Tween 80 utilizou-se a técnica recomendada por VESTAL (52) e na verificação de DNase, a técnica descrita por DI SALVO (12).

Para a realização das provas de vermelho de metila (VM) e produção de acetoina (VP), utilizaram-se técnica e meios recomendados por BIER (2).

Na determinação das características bioquímicas acima descritas, foram utilizados sempre controles positivos e negativos, a fim de se verificar a validade dos resultados obtidos.

3. Determinação de características sorológicas.

3.1. Soros hiper-imunes.

Foi preparado num total de 19 soros, cuja relação pode ser encontrada na Tabela III. A seleção dos anti-soros a serem preparados foi obtida através da técnica de hemaglutinação passiva, adiante descrita (3.4.3). Para tal, fez-se reagirem, dentro de cada patotipo, hemácias sensibilizadas com extratos homólogos e isólogos frente a um anti-soro arbitrariamente escolhido como representativo do grupo, nos casos em que

T A B E L A III

Relação das amostras de *Xanthomonas campestris*
(Pammel) Dowson utilizadas como antígenos no
preparo de anti-soros

Soros	Antígenos (patotipos) utilizados no preparo de anti-soros
1	<i>campestris</i> (ca-134).
2	<i>citri</i> (ci-130).
3	<i>cucurbitae</i> (cu-2173).
4	<i>cucurbitae</i> (cu-s/n).
5	<i>dieffenbachiae</i> (di-140).
6	<i>esculenti</i> (es-568).
7	<i>glycines</i> (gl-2076).
8	<i>glycines</i> (gl-2209).
9	<i>hederae</i> (he-2170).
10	<i>malvacearum</i> (ma-1772).
11	<i>mangiferaeindicae</i> (mi-2097).
12	<i>manihotis</i> (mh-975).
13	<i>phaseoli</i> (ph-2099).
14	<i>ricini</i> (ri-113).
15	<i>vesicatoria</i> (ve-793).
16	<i>vesicatoria</i> (ve-2201).
17	<i>vitians</i> (vi-2008).
18	<i>vitians</i> (vi-2009).
19	sp. (sp-s/n).

este era composto por mais de uma amostra.

3.2. Preparo de antígenos bacterianos.

Garrafas de Roux, contendo cerca de 150 ml de meio BDA, foram semeadas com cada uma das 19 amostras e incubadas a 28°C por 48 a 72 horas. Em seguida, o material bacteriano crescido em cada garrafa foi suspenso em 20 ml de solução fisiológica estéril, contendo 0,6% de formol neutro. A suspensão resultante foi centrifugada a 5.000 rpm durante 15 minutos e o sedimento lavado 3 vezes com solução fisiológica estéril, sendo em seguida ressuspenso em 10 ml desta mesma solução.

O número de bactérias em suspensão foi padronizado pelo método fotométrico de STALL & COOK (46), que se baseia no fato de que uma suspensão bacteriana de microrganismos do gênero *Xanthomonas* que apresente 50% de transmitância, no comprimento de onda 600 nm, contém 10^8 células/ml.

3.3. Inoculações.

Foram usados coelhos adultos mantidos em dieta comum. Após a retirada de 5 ml de sangue, para a obtenção de soro normal a ser usado como controle, suspensões bacterianas padronizadas, conforme descritas acima (3.2), foram injetadas na veia marginal da orelha em doses de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,0 ml, com intervalos de 2 dias entre cada injeção. Sete dias após a última injeção, os coelhos foram sangrados por

punção cardíaca. Deixava-se coagular o sangue e adicionava-se ao soro obtido mertiolato na concentração final de 1/10.000. Os soros eram então distribuídos em frascos de 5 ml e mantidos em congelador a -20°C.

3.4. Técnica da reação sorológica.

3.4.1. Preparo de extrato de exopolissacarídeos.

Foram preparados extratos de exopolissacarídeos de 31 culturas de patotipos de *Xanthomonas campestris*. Para esta finalidade utilizamos, com algumas modificações, o método de CARTER & HYNTON (4), descrito para obtenção de extrato de *Corynebacterium equi*. As bactérias foram cultivadas em garrafas de Roux, contendo o meio de BDA e incubadas a 28°C por 72 horas. Em cada uma das garrafas contendo os cultivos dos patotipos de *X. campestris* foram adicionados 20 ml de solução fisiológica estéril, contendo 0,6% de formol neutro. Após agitação com o auxílio de bastão de vidro estéril, introduzido nas garrafas a suspensão resultante era colocada em banho-maria sob agitação, a 56°C durante 30 minutos. Em seguida, o material era centrifugado a 8.000 rpm durante 30 minutos, o suficiente para promover a sedimentação das células bacterianas. O sobrenadante assim obtido, extrato de exopolissacarídeos bacterianos, de consistência viscosa, foi colocado a -20°C, adicionando-se antes mertiolato na concentração de 1/10.000.

3.4.2. Dosagem de polissacarídeos.

Para a realização do teste de hemaglutinação, descrito a seguir (3.4.3), verificou-se, conforme já havia sido observado por PERREAU & CARTER (43), que a quantidade de polissacarídeos contidos no extrato bacteriano poderia interferir na sensibilização das hemácias alterando, embora ligeiramente, o título do soro examinado. Tornou-se necessário, portanto, realizar a dosagem de polissacarídeos de todos os extratos de exopolissacarídeos bacterianos utilizando-se o método de DUBOIS et al (13).

3.4.3. Técnica da reação de hemaglutinação passiva.

A hemaglutinação passiva foi realizada seguindo a técnica de CARTER & HYNTON (4), por nós modificada.

3.4.3.1. Absorção dos anti-soros.

A fim de evitar a interferência do anticorpo heterófilo nas reações de hemaglutinação, todos os anti-soros foram absorvidos com hemácias de carneiro.

Os anti-soros foram inicialmente diluídos a 1/10 com tampão fosfato-salina 0,15 pH 7,2 e em seguida decomplementados a 56°C durante 30 minutos. A absorção foi realizada adicionando-se, a cada 2 ml de anti-soro diluído e inativado, 0,3 ml de papa de hemácias de carneiro. A mistura, hemácias e anti-soro, foi mantida em temperatura ambiente, por uma hora, com agitação a cada 20 minutos, aproximadamente. Após esse pe-

ríodo, o material foi centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante (anti-soro absorvido) colocado novamente a -20°C , sendo retirado somente nos dias de sua utilização.

3.4.3.2. Sensibilização das hemácias de carneiro.

Conforme comentado em 3.4.2., foi preciso utilizar extratos padronizados para a sensibilização de hemácias. A necessidade da padronização foi verificada pelo emprego de hemácias sensibilizadas com diferentes diluições de 8 extratos bacterianos, frente a várias diluições dos respectivos soros homólogos. Observou-se em todos os casos que o maior título era conseguido quando as hemácias foram sensibilizadas com cerca de $100\ \mu\text{g/ml}$ de extrato de exopolissacarídeos bacterianos. Foi observado ainda que variações na concentração de polissacarídeos de $50\ \mu\text{g/ml}$ a $200\ \mu\text{g/ml}$ apresentaram os mesmos resultados. Somente variações extremas interferiram no título final obtido. Por este motivo, selecionamos para todos os extratos a concentração de $100\ \mu\text{g/ml}$ de polissacarídeos como a quantidade ótima para a sensibilização de hemácias.

Para cada 1 ml de extrato de exopolissacarídeos bacterianos dosado a $100\ \mu\text{g/ml}$, adicionou-se 0,1 ml de papa de hemácias de carneiro. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante duas horas, com agitação intermitente. Após esse tempo, as hemácias foram lavadas duas vezes com tampão fosfato-salina 0,15M pH

7,2 e ressuspensas em 20 ml do mesmo tampão.

3.4.3.3. Técnica da reação.

Os testes de hemaglutinação passiva foram todos realizados em placa de acrílico, com orifícios padronizados, nos quais eram inseridos batoques de poliestireno com capacidade de 1 ml, facilmente removíveis para lavagem e reposição.

Os anti-soros absorvidos foram diluídos em série, razão 2, de 1/10 a 1/163.840, utilizando-se como diluente tampão fosfato-salina 0,15M pH 7,2. Em cada batoque da placa de hemaglutinação foi colocado 0,25 ml de cada diluição de anti-soro, adicionando-se, em seguida, igual volume de hemácias sensibilizadas. A leitura foi realizada após permanência em temperatura ambiente por 2 horas, tomando-se como título final aquela diluição do anti-soro que ocasionava 50% de hemaglutinação.

Amostras cujos extratos reagiram com seus anti-soros em reação homóloga e heteróloga foram considerados como pertencentes a um mesmo sorotipo quando na reação inversa, isto é, anti-soros frente a extratos foram demonstradas relações sorológicas equivalentes. Os casos que não se enquadraram no critério adotado se acham devidamente comentados no capítulo de discussão.

Como controles negativos, para avaliar a especificidade da reação, foram examinados, pela mesma técnica, soros de 5 coelhos aparentemente normais, frente a hemácias sensibilizadas por extratos, representativos

de cada um dos tipos sorológicos por nós descritos, e apresentados no capítulo dos resultados.

4. Verificação da produção de bacteriocinas.

Para verificar a produção de bacteriocinas pelas amostras de *Xanthomonas campestris*, foi utilizado o método recomendado por HARTING et al. (29), com algumas modificações exigidas pelas características culturais do gênero em questão.

Em resumo, cada uma das amostras por nós estudadas foi semeada em estria no centro de uma placa contendo o meio de BDA. Após incubação por 72 horas a 28°C, o crescimento resultante era raspado com "cotonete" estéril, submetendo-se em seguida as placas ao tratamento por vapores de clorofórmio, durante 30 minutos. As placas eram em seguida colocadas em estufa a 37°C, durante uma hora aproximadamente, para a evaporação do clorofórmio residual.

As culturas a serem examinadas quanto à sensibilidade ou não a bacteriocina, porventura produzida pela amostra estudada, eram então semeadas perpendicularmente à zona do crescimento original desta. Após a semeadura, geralmente 8 por placa, incubava-se o material a 28°C por 72 horas e verificava-se então se ocorria, nas proximidades do eixo de semeadura, inibição de crescimento das amostras testadas.

5. Determinação da sensibilidade a drogas.

Para avaliar a sensibilidade a drogas, empregamos o método da diluição em placa, conforme preconizado por FERNANDES (24) e por nós ligeiramente modificado.

5.1. Drogas.

As drogas empregadas e seus diluentes encontram-se na Tabela IV.

T A B E L A I V
Drogas empregadas e seus diluentes

Drogas	Origem	Diluentes
Sulf. Estreptomicina	Labort.Bristol	água destilada.
Sulf. Neomicina	Labort.Bristol	água destilada.
Sulf. Kanamicina	Labort.Bristol	água destilada.
Gentamicina	Schering	água destilada.
Ampicilina	Labort.Bristol	tamp.fosf. 0,01N pH 8,0.
Tetraciclina	Pfizer	álcool metílico e tamp.fosf. 0,01N pH4,5
Cloranfenicol	Carlo Erba	álcool metílico e tamp.fosf. 0,01N pH6,0
Sulf. Polimixina	Labort.Bristol	água destilada.
Sulfadiazina	Labort.Bristol	água destilada com NaOH 1 N (1/20).

5.2. Soluções estoques.

As soluções estoques das drogas foram preparadas quinzenalmente e conservadas no congelador e distribuídas em porções de 5 ml. Estas soluções continham 10 mg da base de cada drogas por ml.

5.3. Preparo das placas.

As placas eram preparadas sempre no dia do uso, utilizando-se como meio básico, o Mueller Hinton ágar, para todas as drogas estudadas, exceção feita para a sulfadiazina. Com relação a esta, foi usado o meio mínimo recomendado por LARPENT & LARPENT-GOURGAUD (35), por nós modificado. Esta modificação consistiu em aumentar a quantidade de glicose de 0,8% para 1,6%.

Na Tabela V encontram-se as quantidades e diluições dos ingredientes necessários à obtenção da concentração desejada da droga em cada placa.

5.4. Técnica.

O inóculo das amostras em estudo foi o conteúdo de uma alça de platina de 2 mm de diâmetro, retirado de uma cultura em caldo simples incubado a 28°C por 48 horas e diluída 1/1.000 em água fisiológica.

Em cada placa foram estudadas 16 culturas de patótipos de *Xanthomonas campestris*, usando-se sempre como testemunha da atividade das drogas uma amostra de *E. coli* K 12, sabidamente sensível a todas as drogas desde as concentrações mínimas utilizadas.

Também foram preparadas placas contendo apenas

T A B E L A V

Quantidade das soluções estoques e de meio de cultura para se obter a concentração desejada da droga

Solução estoque ml	Dil. da sol. estoque	meio de cultura ml	Con.final de drogas $\mu\text{g/ml}$
2,0	-	18,0	1.000
1,0	-	19,0	500
0,4	-	19,6	200
2,0	1/10	18,0	100
1,0	1/10	19,0	50
0,4	1/10	19,6	20
2,0	1/100	18,0	10
1,0	1/100	19,0	5
0,4	1/100	19,6	2
0,2	1/100	19,8	1

os meios de cultura e que serviram como testemunhas da viabilidade das amostras.

Os resultados eram lidos após 72 horas de incubação a 28°C, para sementeiras feitas em meio de Mueller-Hinton e após 96 horas para aquelas feitas em meio mínimo. Considerou-se como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração da droga capaz de impedir o crescimento do germe e como nível de resistência a concentração anterior.

CAPÍTULO IIIR E S U L T A D O S1. Características bioquímicas.

Determinamos as características bioquímicas de 31 amostras de microrganismos, compreendendo um total de 15 patotipos de *Xanthomonas campestris*.

Todas as amostras foram oxidase positivas, produziram catalase, não reduziram nitrato a nitritos e se comportaram como oxidativas na prova de oxidação-fermentação (O-F).

Todas as amostras produziram H_2S , foram capazes de hidrolisar a gelatina, caseína e produzir fenilalanina deaminase. A pesquisa da produção de indol e de urease foi negativa para todos os patotipos estudados.

A hidrólise da tirosina foi positiva para todos os patotipos, com exceção de duas amostras do patotipo *ricini* que forneceram resultados negativos.

Nenhuma das amostras foi capaz de utilizar aspargina como única fonte de carbono e nitrogênio.

A hidrólise do Tween 80 foi constantemente positiva, observando-se no entanto variações nas provas de lecitinase e na formação de "pearly layer", havendo correspondência absoluta de positividade entre estas duas últimas provas. Das amostras estudadas, 23 produziram lecitinase e formaram "pearly layer". Entre as negativas encon-

tramos duas amostras do patotipo *malvacearum* e seis amostras do patotipo *vesicatoria*.

A pesquisa da atividade sobre ácido nucléico através da prova DNase foi positiva.

Todas as amostras foram negativas nas provas de VM e VP, mas foram capazes de utilizar o malonato e gluconato.

Com relação ao estudo da atividade oxidativa sobre carboidratos e poliálcoois, houve a utilização dos seguintes compostos: arabinose, celobiose, galactose, glicose, manose, sacarose e xilose. Nas amostras por nós estudadas não foi possível demonstrar a oxidação das seguintes fontes de carbono: adonitol, α metil D glicose, dulcitol, inositol, inulina, rafinose, salicina e sorbitol.

Quanto as demais fontes de carbono, os resultados observados foram variáveis. Tais variações, entretanto, em alguns casos não foram pronunciadas, como aconteceu por exemplo com a frutose, glicerol, melebiose, ramnose e trealose, onde apenas uma amostra apresentou resultado oposto ao demonstrado pelas amostras restantes.

A verificação de hidrólise do amido pelo método recomendado por COWAN & STEEL (8), forneceu também resultados variáveis, porém não confrontáveis com o observado no meio de DYE (16), contendo 0,5% de amido e indicador.

Os resultados das provas bioquímicas encontram-se na Tabela VI.

T A B E L A VI

Características bioquímicas das 31 amostras de 15 patótipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson

Oxidase	+
Catalase	+
O-F- Nitrito	Oxidativa -
H ₂ S	+
Indol	-
Urease	-
Gelatinase	+
Caseinase	+
Fenilalaninadeaminase	+
Tirosinase	v: +29(93,54%); -2(6,45%).
Utilização de aspargina como única fonte de carbono e nitrogênio	-
Lecitinase	v: +23(74,19%); -8(25,80%).
"Pearly Layer"	v: +23(74,19%); -8(25,80%).
Hidrólise do Tween 80	+
DNase	+
Gluconato	+
Malonato	+
Hidrólise do amido	v: +23(74,19%); -8(25,80%).
VM	-
VP	-
Adonitol	-
α metil D glicose	-

(continua)

continuação

Amido	v: +22(70,96%); -9(29,03%).
Arabinose	+
Celobiose	+
Dulcitol	-
Frutose	v: +30(96,77%); -1(3,22%).
Galactose	+
Glicerol	v: +30(96,77%); -1(3,22%).
Glicose	+
Inositol	-
Inulina	-
Lactose	v: +23(74,19%); -8(25,80%).
Maltose	v: +19(61,29%); -12(38,70%).
Manitol	v: +8(25,80%); -23(74,19%).
Manose	+
Melebiose	v: +30(96,77%); -1(3,22%).
Melezitose	v: +4(12,90%); -27(87,09%).
Rafinose	-
Ramnose	v: +1(3,22%); -30(96,77%).
Sacarose	+
Salicina	-
Sorbitol	-
Trealose	v: +30(96,77%); -1(3,22%).
Xilose	+

Obs.: Os sinais + ou -, sem outras indicações, significam reação positiva ou negativa em 100% das amostras.

O sinal "v" significa resultados variáveis.

2. Características sorológicas.

Para maior clareza de exposição, relataremos os resultados dos estudos sorológicos de acordo com o desenvolvimento dos trabalhos realizados.

Inicialmente, foram preparados anti-soros contra uma amostra de cada patotipo estudado. Naqueles patotipos com dois ou mais representantes, foi verificado se hemácias sensibilizadas com extratos isólogos eram capazes de ser hemaglutinadas pelo anti-soro preparado. Deste modo, foi verificada a necessidade de serem preparados 19 anti-soros, cuja relação já foi apresentada no capítulo de material e métodos (Tabela III).

Para alguns patotipos observou-se que não houve necessidade de se apresentar mais do que um anti-soro, uma vez que os títulos homólogos e isólogos obtidos na prova de hemaglutinação passiva foram semelhantes. Apresentaram este comportamento todas as amostras do patotipo *vesicatoria*, com exceção da amostra ENA-2201, isolada de beringela. Com relação aos patotipos *campestris*, *citri*, *malvacearum* e *ricini* também não houve necessidade de preparar mais do que um anti-soro.

Por outro lado, com relação aos patotipos *cucurbitae*, *glycines* e *vitians* foi necessário o preparo de anti-soros contra as duas amostras representativas de cada um destes patotipos.

Com relação aos patotipos *dieffenbachiae*, *esculenti*, *hederae*, *mangiferaeindicae*, *manihotis* e

phaseoli, não foram possíveis estudos desta natureza, uma vez que contávamos com apenas uma amostra para cada um destes patotipos. Os anti-soros preparados com estas amostras foram então considerados como representativos dos mesmos.

Os resultados dos testes de hemaglutinação indireta realizados com hemácias sensibilizadas pelas 31 amostras dos 15 patotipos de *Xanthomonas campestris*, frente aos 19 anti-soros preparados no presente trabalho, se encontram na Tabela VII.

Salvo alguns resultados aparentemente discordantes, comentados no capítulo de discussão, ao exame da Tabela VII, tomando-se como base os resultados das reações dos anti-soros contra hemácias sensibilizadas, foi possível agrupar as amostras estudadas em 9 sorotipos diferentes. A distribuição das amostras de *X. campestris* pertencentes a estes sorotipos encontra-se na Tabela VIII.

O resultado das provas de hemaglutinação passiva realizadas com soros obtidos de coelhos aparentemente normais forneceu títulos sempre inferiores a 1/20. motivo pelo qual nos testes de hemaglutinação cruzada descritos na Tabela VII, resultados semelhantes foram considerados inexpressivos.

3. Produção de bacteriocinas.

Quando se realizaram os testes cruzados para verificação da produção de bacteriocinas, utilizando as 31 amostras por nós estudadas, verificou-se que 13 (41,9%)

TABELA VII

Resultados dos testes de hemaglutinação passiva com 31 amostras de 15 patótipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson frente a 19 anti-soros preparados com amostras destes microrganismos

Anti-soros	ANTÍGENOS - <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson f.sp.																																		
ca-134	10																																vi-2009		
ci-130		n	n																														vi-2008		
cu-2173		n	n	10																													ve-2201		
cu-s/n		n	n		11																												ve-833		
di-140		n	n			11																											ve-818		
es-568		n	n			11																											ve-804		
he-2170		n	n				12																										ve-793		
gl-2076		n	n					12																										ve-792	
gl-2209		n	n						12																									ve-791	
ma-1772		n	n							11																								ve-734	
mi-2097		n	n								12																							ve-76	
mh-975		n	n									12																						sp-s/n	
ph-2099		n	n										12																					ri-779	
ri-113		n	n											12																				ri-113	
ve-793		n	n												10																			ph-2099	
ve-2201		n	n													10																		mh-975	
vi-2008		n	n														10																	mi-2097	
vi-2009		n	n															10																mh-975	
sp-s/n		n	n																10															ph-2099	
		n	n																		10													ri-113	
		n	n																			10												ve-793	
		n	n																				10												ve-2201
		n	n																					10											vi-2008
		n	n																						11										vi-2009
		n	n																							11									sp-s/n

Obs.: Os números 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 indicam respectivamente títulos de 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, 1/10240 e 1/20480.

- = reação negativa (inferior a 1/20).
n = reação não realizada.

T A B E L A VIII

Distribuição das amostras de *Xanthomonas campestris*
(Pammel) Dowson pertencentes a 9 sorotipos descritos
pela técnica de hemaglutinação passiva

Sorotipos	Amostras
1	ca-(134, 903 e s/n).
2	ci-(130 e s/n).
3	cu-(2173); gl-(2076) e sp-(s/n).
4	cu-(s/n); es-(568); ve-(76, 734, 791, 792, 793, 804, 818, 833) e vi-(2008).
5	di-(140) e ve-(2201).
6	gl-(2209); he-(2170); ma-(1772 e 2216) e vi-(2009).
7	mh-(975).
8	mi-(2097) e ph-(2099).
9	ri-(113 e 779).

foram capazes de produzir bacteriocinas.

A relação das amostras produtoras de bacteriocinas e das amostras sensíveis a estas se encontram na Tabela IX, onde podemos verificar que as amostras ci-(s/n); gl-(2076); ma-(1772); ma-(2216); ph-(2099); ri-(113); ri(779); ve-(792) e vi-(2009) produziram apenas uma bacteriocina.

Com relação às amostras ci-(130); gl-(2209); he-(2170) e mi-(2097), podemos supor a produção de uma ou mais bacteriocinas, uma vez que existiram para cada uma delas duas ou três amostras indicadoras.

De qualquer modo, a inclusão do estudo da produção de bacteriocinas em nosso trabalho teve como intuito principal verificar diferenças na produção de bacteriocinas, pelas amostras de *Xanthomonas campestris*, sem propriamente tentar averiguar, pela falta de recursos, se estas diferenças eram devidas a uma ou mais bacteriocinas. Assim, por exemplo, para a amostra mi-(2097) foram indicadoras da produção de bacteriocinas as amostras ve-(804 e 833) e vi-(2009) e para a amostra gl-(2209) foram indicadoras as amostras ve-(804 e 833) e di-(140). É provável que estas duas bacteriocinas sejam diferentes ou que as diferenças observadas quanto às amostras indicadoras vi-(2009) e di-(140) sejam conseqüência de outras bacteriocinas produzidas pelas amostras mi-(2097) e gl-(2209), diferentes daquela que foi capaz de ser identificada pelas amostras ve-(804 e 833). (Figura I).

T A B E L A IX

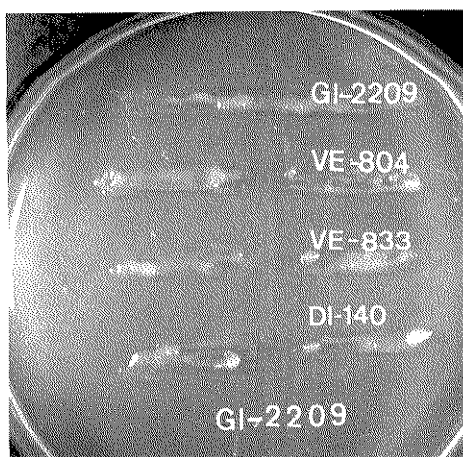
Relação das amostras de *Xanthomonas campestris*
(Pammel) Dowson produtoras de bacteriocinas e
das amostras sensíveis utilizadas como
indicadoras

Tipos de Bacteriocinas	Produtoras	Amostras sensíveis
1	ci-(130)	cu-(s/n) e mi-(2097).
2	ci-(s/n)	mi-(2097).
	ma-(1772)	mi-(2097).
	ma-(2216)	mi-(2097).
	ph-(2099)	mi-(2097).
	ri-(113)	mi-(2097).
	ri-(779)	mi-(2097).
3	gl-(2076)	ve-(734).
4	gl-(2209)	di-(140) e ve-(804 e 833).
5	he-(2170)	gl-(2209) e vi-(2009).
6	mi-(2097)	ve-(804 e 833) e vi-(2009).
7	ve-(792)	ri-(779).
8	vi-(2009)	ve-(804).

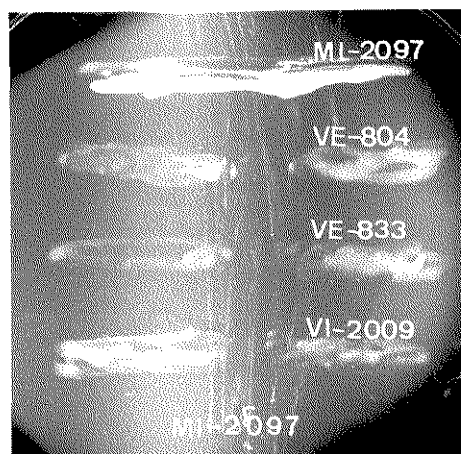
Diante destas considerações, vamos supor que as amostras ci-(130); gl-(2209); he-(2170) e mi-(2097) tenham produzido apenas uma bacteriocina.

Assim sendo, foi possível classificar as bacteriocinas produzidas, quanto ao comportamento frente às amostras indicadoras, em 8 tipos por nós denominados arbitrariamente com algarismos arábicos (Tabela IX).

O exame da Tabela IX permite verificar ainda que a amostra mi-(2097), indicadora da produção de bacteriocina dos tipos 1 e 2, foi capaz de produzir bacteriocina do tipo 6 e finalmente a amostra gl-(2209), sensível à bacteriocina do tipo 5, foi capaz de produzir bacteriocina do tipo 4. Conforme veremos no capítulo de discussão, tais resultados são compatíveis com o que se conhece sobre o mecanismo que rege a produção de bacteriocinas.



1a



1b

Figura 1 - Produção de bacteriocinas pelas amostras gl-2209 (fig. 1a) e mi-2097 (fig. 1b).

4. Sensibilidade a drogas.

Os resultados das provas de sensibilidade a drogas encontram-se na Tabela X.

Com relação à tetraciclina, verificou-se que todas as amostras foram impedidas em concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g/ml}$.

No que concerne à polimixina, verificou-se que 29 amostras já não cresciam na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, exceções feitas a duas amostras que não cresceram em 5 $\mu\text{g/ml}$.

Os resultados referentes a gentamicina foram semelhantes, para todas as amostras, observando-se que a maioria delas foi impedida por concentração de 2 $\mu\text{g/ml}$, exceção feita a uma amostra que foi capaz de crescer nesta concentração.

O comportamento das amostras, frente aos demais antibióticos, foi bastante variável. Assim sendo, para a estreptomicina, observou-se que a maioria das amostras, ou seja, 26 foram impedidas por concentração de até 5 $\mu\text{g/ml}$ da droga; 3 foram sensíveis a 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 a 20 $\mu\text{g/ml}$ e finalmente 1 a 200 $\mu\text{g/ml}$. No que diz respeito à neomicina, a faixa de impediência da droga para a maioria das amostras esteve situada entre 2 e 5 $\mu\text{g/ml}$. Fizeram exceção duas amostras que foram inibidas por 10 $\mu\text{g/ml}$ e uma outra por 50 $\mu\text{g/ml}$ da droga.

No que concerne à Kanamicina, as concentrações

TABELA X

Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) de Estreptomina, Neomicina, Kanamicina, Gentamicina, Ampicilina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Polimixina e Sulfadiazina para 31 amostras pertencentes a 15 patótipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson

	Estreptomina	Neomicina	Kanamicina	Gentamicina	Ampicilina	Tetraciclina	Cloranfenicol	Polimixina	Sulfadiazina
ca-134	5	5	50	2	5	2	5	5	5
ca-903	5	5	2	2	1	2	2	1	100
ca-s/n	5	5	10	2	10	2	10	1	100
ci-130	5	2	2	2	5	2	2	1	200
ci-s/n	5	2	2	2	5	2	2	1	200
cu-2173	5	50	100	2	5	2	5	5	20
cu-s/n	5	5	10	2	5	2	2	1	5
di-140	2	2	1	2	100	2	5	1	500
es-568	5	5	10	2	5	2	5	1	200
gl-2076	5	2	2	2	2	2	5	1	200
gl-2209	5	2	2	2	1	1	5	1	200
he-2170	10	5	2	5	500	1	5	1	20
ma-1772	5	5	2	2	5	2	5	1	5
ma-2216	5	5	1	2	2	2	5	1	20
mi-2097	5	5	2	2	5	1	5	1	500
mh-975	5	5	1	1	1	2	2	1	500
ph-2099	5	5	2	1	5	2	5	1	200
ri-113	5	2	1	2	5	2	2	1	20
ri-779	5	5	1	1	100	2	2	1	200
ve-76	200	5	50	2	5	2	20	1	5
ve-734	5	2	2	1	2	1	1	1	20
ve-791	10	5	2	2	5	2	5	1	5
ve-792	10	5	50	2	5	2	10	1	20
ve-793	5	2	2	2	1	1	5	1	10
ve-804	5	5	2	2	5	2	5	1	10
ve-818	5	5	2	2	20	2	10	1	100
ve-833	5	5	2	2	5	2	5	1	10
ve-2201	20	10	20	2	5	2	5	1	100
vi-2008	2	1	1	2	2	1	5	1	50
vi-2009	5	2	2	2	2	1	2	1	20
sp-s/n	5	10	100	2	5	2	5	1	100

de até 2 $\mu\text{g/ml}$ foram suficientes para impedir 22 amostras. Três foram sensíveis a 10 $\mu\text{g/ml}$; uma a 20 $\mu\text{g/ml}$; 3 a 50 $\mu\text{g/ml}$ e finalmente 2 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Para a ampicilina, a maioria das amostras foi impedida por concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$, excetuando-se uma amostra sensível a 10 $\mu\text{g/ml}$; uma amostra sensível a 20 $\mu\text{g/ml}$; duas a 100 $\mu\text{g/ml}$ e finalmente uma a 500 $\mu\text{g/ml}$.

Os dados obtidos para o cloranfenicol indicaram que 27 amostras eram impedidas na concentração de até 5 $\mu\text{g/ml}$, restando 3 amostras sensíveis a 10 $\mu\text{g/ml}$ e 1 a 20 $\mu\text{g/ml}$.

Finalmente, com relação à sulfadiazina, a variação observada foi ainda maior, encontrando-se respectivamente para concentrações de 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$, 5, 3, 7, 1, 5, 7 e 3 amostras sensíveis.

CAPÍTULO IVD I S C U S S Ã O1. Características bioquímicas.

Os resultados da maioria das provas bioquímicas estudadas no presente trabalho demonstraram que as bactérias do gênero *Xanthomonas* têm comportamento relativamente uniforme. Foram observadas variações no comportamento das amostras em 14 testes dos 46 por-nós utilizados.

Como era de se esperar, a maior variação ocorreu nos testes de avaliação da atividade oxidativa. Entre 25 provas desta categoria, foram observados resultados variáveis em 11 delas. Esta variação, entretanto, não foi tão concreta pois, com relação a frutose, glicerol, melebiose, ramnose e trealose, houve a discordância dos resultados em apenas uma amostra. (Tabela VI).

Embora não tivéssemos representado na Tabela VI, detalhadamente, os resultados das provas bioquímicas, verificou-se que tais variações foram inconsistentes quanto a uma possível contribuição para a identificação dos patotipos. Assim sendo, a fermentação da ramnose, por uma amostra do *campestris*, ca-(134), não foi observada em outra amostra do mesmo patotipo. Com relação à melebiose, uma amostra do patotipo *citri*, ci-(130), não oxidou a este açúcar, ao contrário de outra amostra, ci-(s/n). Resultados semelhantes foram observados para duas amostras do

patotipo *ricini*.

As demais variações observadas também deixaram dúvidas quanto à sua utilidade. É o caso, por exemplo, da melezitose, que foi oxidada por 2 amostras do patotipo *vesicatoria* e por uma do patotipo *campestris*. Considerações idênticas poderiam ser feitas quanto às demais variações, observadas nas provas relacionadas com a atividade oxidativa.

Com relação às provas bioquímicas restantes, o comportamento foi bem mais homogêneo, observando-se variações em 4 provas das 21 estudadas. Levando-se em conta que a maioria dessas provas está relacionada com aspectos mais gerais do metabolismo bacteriano, ao nosso ver era de se esperar esta homogeneidade. Fizeram exceção a hidrólise do amido, a produção de lecitinase e "pearly layer" e a utilização de aspargina como única fonte de carbono e nitrogênio.

No que diz respeito à hidrólise do amido, tem-se afirmado que as amostras do patotipo *vesicatoria* isoladas de pimentão são incapazes de hidrolisar este carboidrato, ao passo que as isoladas de tomateiro podem fazê-lo (7).

Os nossos resultados demonstraram que tal afirmação não corresponde à realidade, pois uma das amostras deste patotipo, isolada de tomateiro, ve-(793), não hidrolisou o amido. Chamou nossa atenção o fato de que dos 8 resultados negativos para hidrólise do amido, 7 foram proporcionados pelo patotipo *vesicatoria*.

No que tange à produção de lecitinase e "pearly layer", os resultados negativos se concentraram nas amostras dos patotipos *malvacearum* e *vesicatoria*, fornecendo resultados positivos para os demais. A observação de dois resultados positivos para o patotipo *vesicatoria*, invalida a utilização destas provas para a identificação deste patotipo, porém os resultados obtidos com relação ao patotipo *malvacearum* talvez devessem ser melhor estudados, investigando-se maior número de amostras.

No que concerne à utilização da tirosina, os resultados observados demonstraram que apenas as duas amostras do patotipo *ricini* não foram capazes de desdobrar este aminoácido. Considerando-se que algumas particularidades, tal como a produção de pigmento marrom difusível em meio sólido, têm caracterizado este patotipo (16), talvez esta prova devesse também ser melhor estudada.

De qualquer modo, uma avaliação mais crítica dos resultados por nós alcançados leva-nos a concordar com DYE (16,17), DYE & LELLIOTT (18) e HAYWARD (25) sobre a impossibilidade de se caracterizar com segurança os diferentes patotipos de *Xanthomonas campestris*, tomando como base exclusivamente provas bioquímicas.

2. Características sorológicas.

Os resultados dos estudos sorológicos apresentaram vários aspectos importantes. Para os patotipos *campestris*, *citri*, *malvacearum* e *ricini*, embora tivessem

sido estudadas apenas duas ou três amostras de cada um de les, foi possível demonstrar relações sorológicas estreitas entre as mesmas.

Outro grupo, composto de um número maior de amos tras, que apresentou certa homogeneidade no comportamento sorológico, foi o do patotipo *vesicatoria*. Oito entre nove amostras deste grupo foram consideradas, nos testes so rológicos por nós realizados, como semelhantes, uma vez que hemácias sensibilizadas por extratos de exopolissacarídeos destas amostras apresentaram títulos equivalentes nas reações contra anti-soros homólogos e isólogos. Estes resultados discordam dos relatados por LOVREKOVICH & KLEMENT (38) e MORTON et al. (39), que verificaram ser possível através de testes de dupla difusão em gel de ágar diferenciar amostras deste patotipo, isoladas de tomateiro e de pimentão. Revendo o trabalho destes autores, verifica-se, entre outras coisas, que o tipo de extrato empregado, obtido por rompimento bacteriano, poderia ser na realidade uma mistura de vários antígenos, o que justificaria, em parte, os resultados por eles obtidos. Além do mais, reações menos intensas, porém evidentes, foram obtidas nos testes realizados com os antígenos de amostras isoladas de tomateiro ou de pimentão contra, respectivamente, anti-soros preparados com amostras de pimentão e de tomateiro.

Não pudemos também confirmar o trabalho de CHARUDATTAN et al. (7), que descreveram 2 tipos sorológi-

cos do patotipo *vesicatoria* para isolados de pimentão e de tomateiro, sem relação entretanto com a origem do hospedeiro.

A outra amostra de *X. campestris* f.sp. *vesicatoria* isolada de beringela não se relacionou sorologicamente com as outras amostras deste patotipo, mostrando, como já verificamos no capítulo de resultados, que poderia ser incluída no mesmo sorotipo do patotipo *dieffenbachiae* (Tabelas VII e VIII).

Embora para os patotipos *cucurbitae*, *glycines* e *vitians* tivessem sido estudadas, de cada um deles, apenas duas amostras, os resultados obtidos demonstraram que estes patotipos podem conter pelo menos dois sorotipos cada (Tabela VIII).

Uma análise mais detalhada dos estudos sorológicos permitiu-nos observar dois aspectos relevantes:

- a) amostras pertencentes ao mesmo patotipo podem não se relacionar sorologicamente, e
- b) amostras pertencentes a diferentes patotipos podem integrar um mesmo sorotipo.

Ainda que tenha sido relativamente fácil agrupar as amostras estudadas em sorotipos, algumas das reações obtidas merecem comentário em separado. Assim sendo, foi observado que hemácias sensibilizadas por extratos de exopolissacarídeos do patotipo *citri* (ci-130) foi capaz de reagir fortemente com anti-soro preparado com patotipo *manihotis*, não se observando qualquer reação quando se

utilizou como antígeno extrato de *manihotis* e anti-soro contra o ci-130 (Tabela VII). Embora em grau menos intenso, resultados semelhantes foram obtidos por NAMEKATA (40), ao examinar, por provas de precipitação em tubo, as relações sorológicas entre estes patotipos. Estudos mais profundos se tornam necessários para esclarecer estes achados. Uma possibilidade, a ser comprovada, seria a existência, no exopolissacarídeos do patotipo *manihotis*, de um determinante antigênico interno, semelhante ao determinante antigênico específico do patotipo *citri*.

Reações semelhantes foram observadas para hemácias sensibilizadas com patotipo *ricini* frente ao anti-soro *hederae*, he-2170. Quando as hemácias foram sensibilizadas por extrato de patotipo *hederae*, não foi observada qualquer reação. Resultados idênticos foram ainda obtidos na reação de hemácias sensibilizadas com o patotipo *esculenti* frente ao anti-soro preparado com amostra cu-2173 (Tabela VII).

Seria interessante lembrar ainda que embora não se tenham observado relações absolutas entre sorotipos e patotipos, os resultados por nós alcançados trazem, ao nosso ver, importante contribuição para a caracterização de alguns patotipos e abrem perspectivas para que este tipo de estudo seja ampliado, com o exame de maior número de amostras, em virtude da simplicidade da técnica utilizada. Com relação ao encontro de diferentes patotipos fazendo parte de um mesmo sorotipo ou de amostras de um mes

mo patotipo situadas em sorotipos diferentes, sem querer menosprezar a validade dos testes de especificidade de hospedeiro, que até agora têm sido utilizados para caracterizar patotipos, gostaríamos de lembrar algumas considerações feitas por DYE (15). Segundo este autor, o caráter de especificidade do hospedeiro não deve ser encarado de modo tão rígido, pois existem evidências de que "os microrganismos do gênero *Xanthomonas* não sejam tão estritos quanto a especificidade do hospedeiro". Este mesmo autor comenta ainda sobre a inutilidade dos testes de patogenicidade nos casos em que os microrganismos tenham perdido a sua virulência. Exceptuando-se a possibilidade da perda da virulência ocasionar variações na composição antigênica destas bactérias, acreditamos que a técnica sorológica nestes casos poderia prestar valiosa colaboração.

Com relação à escolha do exopolissacarídeo bacteriano, constituído pela camada mucóide, como antígeno nos testes de hemaglutinação passiva, gostaríamos de comentar que tal tipo de antígeno tem sido usado com certa frequência na caracterização de sorotipos de várias espécies bacterianas (4,32,42,43) reforçando deste modo a validade dos resultados por nós obtidos quanto aos sorotipos descritos.

3. Produção de bacteriocinas.

Para facilidade de exposição, alguns dos comentários relativos a esta características já foram feitos no

capítulo de resultados. Resta-nos comentar sobre a utilidade do teste de produção de bacteriocinas para caracterização de algumas amostras de microrganismos do gênero *Xanthomonas*.

Conforme se pode perceber pelos resultados obtidos (Tabelas VII, VIII e IX), não houve relação entre patotipos, sorotipos e a produção de bacteriocinas, com exceção do observado para os patotipos *malvacearum* e *ricini*. Nestes patotipos, as duas amostras de cada um deles estavam relacionados sorologicamente e produziram os mesmos tipos de bacteriocinas, ou seja, do tipo 2.

É interessante notar que as duas amostras do patotipo *vitians* que diferiram quanto às características sorológicas (Tabela VIII), também produziram bacteriocinas diferentes (Tabela IX). Idênticos resultados foram observados com relação às amostras do patotipo *glycines*.

A descrição de diferentes bacteriocinas e das amostras a elas sensíveis nos permite algumas importantes considerações sobre a utilidade deste teste. Assim sendo, conforme foi demonstrado, é possível, através desta análise, distinguir amostras pertencentes a um mesmo patotipo e a um mesmo sorotipo. Como exemplo citaríamos o comportamento das duas amostras do patotipo *citri*, uma delas isolada no Paraná e a outra em Mato Grosso (Tabela II). Ambas foram enquadradas num mesmo sorotipo (Tabela VIII), porém, ao se examinar a produção de bacteriocina, verificou-se que a amostra isolada em Mato Grosso, ci-s/n, pro-

duziu a bacteriocina do tipo 2, isto é, foi ativa contra amostra mi-2097 (Tabela IX). A amostra isolada no Paraná, por outro lado, produziu a bacteriocina do tipo 1, isto é, foi ativa contra cu-s/n e mi-2097. As implicações epifitológicas destes achados são óbvias, principalmente no que concerne à identificação de fontes de infecção para o cancro cítrico. Na eventualidade do aparecimento da doença, em regiões livres da mesma, possivelmente, poder-se-ia, conhecendo o espectro de atividade das bacteriocinas produzidas por amostras do patotipo *citri*, provenientes de diferentes regiões, determinar a origem do patógeno.

No caso do patotipo *ricini* as duas amostras por nós trabalhadas pertenceram ao mesmo sorotipo e produziram o mesmo tipo de bacteriocina (Tabelas VIII e IX). Considerando-se que uma delas, ri-113, foi isolada em Fernandópolis, S.P. e outra, ri-779, em Urca, R.J. (Tabela II), é provável que se trate de uma amostra de mesma origem, embora, como veremos adiante, tenham sido observadas algumas diferenças entre elas no que diz respeito à sensibilidade a drogas.

Finalmente, caberiam aqui algumas considerações de natureza básica. Em primeiro lugar, conforme já comentamos em resultados, a produção de bacteriocinas pelas amostras do *Xanthomonas campestris* obedeceu a uma característica geral de produção das mesmas, isto é, as amostras produtoras de bacteriocinas são imunes às bacteriocinas por elas produzidas. (figura 1). Outro dado que merece ser comentado

diz respeito a um relacionamento, embora frouxo, existente entre produção de bacteriocinas e sensibilidade a fagos. Como se sabe, alguns receptores para fagos o são também para determinados tipos de bacteriocinas (9). Considerando-se que a fagotipagem já foi utilizada como método de caracterização destes microrganismos (38,40), achamos que seriam aconselháveis estudos desta natureza para verificar este relacionamento.

4. Sensibilidade a drogas.

A inclusão do estudo sobre sensibilidade a drogas teve como intuito principal verificar se o comportamento do microrganismo frente a drogas anti-microbianas poderia contribuir para:

a) idealizar meios de cultura adicionando-se drogas às quais a bactéria fosse resistente;

b) caracterizar o gênero em questão ou alguns de seus patotipos.

A análise dos resultados obtidos permite verificar, com relação ao primeiro aspecto, que dificilmente, pelo menos com base nas drogas utilizadas, se poderia idealizar um meio seletivo para microrganismos do gênero *Xanthomonas*, isto porque os níveis de resistência encontrados, embora variáveis, foram relativamente baixos para todas as amostras e para maioria das drogas empregadas. Por outro lado, o comportamento dos microrganismos estudados frente à tetraciclina, gentamicina e polimixina pode-

ria eventualmente ser utilizado na classificação da bactéria, desde que com relação à tetraciclina fossem usados níveis não inferiores a 2 µg/ml e com relação a gentamicina e polimixina a níveis de 5 µg/ml de meio de cultura. À semelhança do que tem sido feito com a fagotipagem e a produção de bacteriocinas, uma outra contribuição que o estudo sobre a sensibilidade a drogas tem trazido diz respeito à identificação de microrganismos de mesmo biotipo e mesmo comportamento sorológico (23). Assim sendo, por exemplo, as duas amostras do patotipo *ricini*, que pertenceram a um mesmo sorotipo e produziram ambas bacteriocina do tipo 2 (Tabelas VIII e IX), excetuando-se a possibilidade de que uma das amostras tenha adquirido resistência para a ampicilina e para a sulfadiazina por mutação ou por fator R, poderíamos supor estarmos diante de amostras diferentes.

Outro caso digno de menção é o comportamento das amostras ve-804 e ve-833, do patotipo *vesicatoria* que se enquadram no mesmo sorotipo (Tabela VIII), ambas isoladas no Rio de Janeiro (Tabela II) e apresentando o mesmo comportamento frente a todas as drogas (Tabela X). Embora não tivessem produzido bacteriocinas, é conveniente lembrar que foram sensíveis às mesmas bacteriocinas, ou sejam, 5 e 6 (Tabela IX).

O encontro de alguns níveis de resistência elevados, para algumas amostras (Tabela X) sugere a possibilidade de que o microrganismo apresente também mutação para

resistência contra estas drogas, como acontece, aliás, com as bactérias em geral e conforme já foi demonstrado para microrganismos do gênero *Xanthomonas* com relação à estreptomicina, penicilina e aureomicina (1).

Embora algumas poucas amostras tivessem apresentado níveis de resistência elevados para duas drogas ao mesmo tempo, como aconteceu para as amostras di-140 e ri-779, ambas resistentes à ampicilina e à sulfadiazina, sugerindo uma possível existência de fator R nestes microrganismos, a confirmação desta hipótese só seria possível com experiências de transferência de resistência por conjugação.

5. Comentários finais.

Para finalizar, gostaríamos de destacar que embora alguns dos propósitos que nortearam a realização do presente trabalho não tivessem sido alcançados, em virtude de propriedades inerentes ao microrganismo em questão, algumas importantes informações puderam ser conseguidas, não só com relação aos resultados obtidos como também no concernente à metodologia empregada. Tanto quanto sabemos o estudo da produção de bacteriocinas e a utilização da técnica de hemaglutinação passiva para a identificação e caracterização de bactérias fitopatogênicas constitui fato inédito. Por outro lado, não temos notícias de estudos sobre a sensibilidade a drogas aplicáveis a bactérias fitopatogênicas em especial do gênero *Xanthomonas*, da maneira como foram realizados no presente trabalho.

CAPÍTULO VRESUMO E CONCLUSÕES

Trinta e uma amostras pertencentes a 15 patótipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, enviadas por outros pesquisadores, foram estudadas quanto às características bioquímicas, sorotipos evidenciados por provas de hemaglutinação passiva, produção de bacteriocinas e sensibilidade a drogas.

Em cada um destes itens os seguintes resultados e conclusões puderam ser obtidos:

1. Características bioquímicas.

1.1. Todas as amostras se comportaram como oxidativas na prova de oxidação-fermentação (O-F); produziram oxidase, catalase, H₂S, gelatinase, caseinase, fenilalaninadeaminase, DNase; utilizaram gluconato e malonato e hidrolisaram o Tween 80. Quanto à produção de nitrito a partir de nitrato, de indol, de urease, e as provas de VM e VP e utilização de aspargina como única fonte de carbono e nitrogênio, os resultados obtidos foram negativos.

Comportamento variável foi observado para as provas de produção de tirosinase, lecitinase, "pearly layer" e hidrólise do amido.

1.2. Nas provas de atividade oxidativa sobre carboidratos e poliálcoois, os resultados foram constantemente positivos para arabinose, celobiose, galactose, glicose, manose, sacarose e xilose. Não foi demonstrada atividade oxidativa sobre adonitol, α metil D glicose, inositol, inulina, rafinose, salicina e sorbitol.

No que diz respeito ao amido, frutose, glicerol, lactose, maltose, manitol, melebiose, melezitose e trealose, foram observados resultados variáveis.

1.3. A análise dos resultados bioquímicos não permitiu a caracterização segura dos diferentes patotipos estudados.

2. Características sorológicas

2.1. As 31 amostras dos 15 patotipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson foram enquadrados em 9 sorotipos, a saber:

Sorotipo 1 - ca-(134,903 e s/n).

Sorotipo 2 - ci-(130 e s/n).

Sorotipo 3 - cu-(2173); gl-(2L76) e sp-(s/n).

Sorotipo 4 - cu-(s/n); es-(568); ve-(76,734,791, 792,793,804,818,833) e vi-(2008).

Sorotipo 5 - di-(140) e ve-(2201).

Sorotipo 6 - gl-(2209); he-(2170); ma-(1772 e 2216) e vi-(2009).

Sorotipo 7 - mh-(975).

Sorotipo 8 - mi-(2097) e ph-(2099).

Sorotipo 9 - ri-(113 e 779).

2.2. Para os patotipos *campestris*, *citri*, *malvacearum* e *ricini*, foram observadas relações sorológicas entre as amostras de cada um deles. A menos que o estudo com maior número de amostras possa comprovar o contrário, acreditamos que a metodologia por nós utilizada possa ser útil na caracterização destes patotipos.

2.3. Para os patotipos *cucurbitae*, *glycines*, *vesicatoria* e *vitians* observou-se que as amostras estavam distribuídas em dois sorotipos para cada um deles.

2.4. De modo geral os resultados dos estudos sorológicos permitem-nos concluir que:

a) amostras pertencentes a um mesmo patotipo podem se relacionar sorologicamente e

b) amostras pertencentes a diferentes patotipos podem integrar um mesmo sorotipo.

3. Produção de bacteriocinas

3.1. Entre 31 amostras estudadas, 13 (41,9%) foram capazes de produzir bacteriocinas. Estas, distribuídas entre os patotipos *citri*, *glycines*, *hederae*, *mangiferaeindicae*, *manihotis*, *phaseoli*, *ricini*, *vesicatoria* e *vitians*, tiveram as suas bacteriocinas incluídas em 8 tipos, com base no seu espectro de

atividade, a saber:

- Tipo 1 - ativa contra cu-(s/n) e mi-(2097).
- Tipo 2 - ativa contra mi-(2097).
- Tipo 3 - ativa contra ve-(734).
- Tipo 4 - ativa contra di-(140) e ve-(804 e 833).
- Tipo 5 - ativa contra gl-(2209) e vi-(2009).
- Tipo 6 - ativa contra ve-(804 e 833) e vi-(2009).
- Tipo 7 - ativa contra ri-(779).
- Tipo 8 - ativa contra ve-(804).

3.2. Não produziram bacteriocinas as amostras pertencentes aos patotipos *campestris*, *cucurbitae*, *dieffenbachiae*, *esculenti* e uma amostra, sp-s/n, isolada de soja perene.

3.3. A produção de bacteriocinas pode ser considerada de utilidade na caracterização de amostras pertencentes a um mesmo patotipo e sorotipo.

3.4. Com exceção do observado para os patotipos *malvacearum* e *ricini*, não houve relação entre patotipos, sorotipos e produção de bacteriocinas.

4. Sensibilidade a drogas

4.1. O comportamento das amostras dos diferentes patotipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, frente a drogas, foi variável, observando-se, entretanto, que todas as amostras foram bastante sensíveis à polimixina, gentamicina e tetraciclina, o que poderia in-

dicar uma possível utilização destes antibióticos para caracterização do gênero.

4.2. Para a sulfadiazina e os demais antibióticos, as concentrações inibitórias mínimas observadas foram igualmente baixas, encontrando-se todavia, em alguns casos, níveis de resistência elevados, sugerindo para algumas amostras, em relação a algumas drogas, a existência de mutação ou eventualmente fatores R.

4.3. A utilização de drogas anti-bacterianas para a elaboração de meios seletivos é inviável, pelo menos com relação àquelas por nós estudadas, em virtude da sensibilidade que os microrganismos apresentaram para as mesmas.

4.4. O conhecimento da sensibilidade a drogas de amostras pertencentes a mesmo patotipo e sorotipo, e que produzam o mesmo tipo de bacteriocina, pode ser eventualmente útil na caracterização das mesmas.

4.5. Não foram observadas relações definidas entre patotipos, sorotipos, produção de bacteriocinas e sensibilidade a drogas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

- 1 - AZEVEDO, J.L. & NEDER, R.N. Comparação entre o crescimento de *Xanthomonas campestris* (Pammel) linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de Pammel Dowson. *Anais da ESALQ*, 20: 163-173, 1963.
- 2 - BIER, O. Bacteriologia e Imunologia. 16.ed. São Paulo, Ed. Melhoramento e EDUSP, 1975. p.1056.
- 3 - BRISANE, P.G. & BOVIRA, A.D. A comparison of methods for classifying *Rhizophere* bacteria. *J.Gen.Microbiol.*, 26: 375-392, 1961.
- 4 - CARTER, G.R. & HYNTON, A. An indirect hemagglutination test for antibodies to *Corynebacterium equi*. *Am.J.Vet.Res.*, 35: 1393-1395, 1974.

(*) De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Referências bibliográficas: normas brasileiras*, PNB-66. Rio de Janeiro, 1969. p.27.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE OF BIOLOGICAL ABSTRACTS. *Biosis list periodicals with coden, title abbreviations, new, changed and ceased titles*. Philadelphia, 1975. p.197.

5. CASTRO, A.F.P. Contribuição para o estudo do *Erysipelotrix rhusiopathiae*. Tese de Doutorado, USP, 1969.
6. CASTRO, A.F.P. Contribuição ao estudo de micobactérias oportunistas isoladas de gânglios linfáticos mesentéricos de suínos aparentemente normais. Tese de Docência-Livre, FCMB de Botucatu, 1974.
7. CHARUDATTAN, R. et al. Serotype of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathol.*, 63: 1260-1265, 1973.
8. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. Manual for the identification of medical bacteria, Grã Bretanha, Cambridge Univ. Pr., 1966. p.217.
9. DAVIS, B.D. et al. Microbiology. Harper & Row, 1967. p. 1464.
10. DE LEY, J. & FRIEDMAN. Similarity of *Xanthomonas* and *Pseudomonas* deoxiribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 89: 1306-1309, 1965.
11. DE LEY, J. et al. DNA homology and taxonomy of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *J. Gen. Microbiol.*, 42: 43-56, 1966.
12. DI SALVO, J.W. Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Tech. Bull.*, 9: 191-195, 1958.

13. DUBOIS, M. et al. Phenol-sulfuric acid reaction.
Meth. Immun. Immunochem., EUA, Williams Chase, 1956.
v 11.
14. DOWSON, W.J. Plant diseases due to bacteria.
London, C.U.P., 1957.
15. DYE, D.W. Host specificity in *Xanthomonas*. *Nature*
(London), 182: 1213-1914, 1958.
16. DYE, D.W. The inadequacy of the usual determinative
tests for the identification of *Xanthomonas* spp.
N.Z.J. Sci., 5: 393-416, 1962.
17. DYE, D.W. Comparative study of the biochemical reaction
of additional *Xanthomonas* spp. *N.Z.J. Sci.*,
6:483-486, 1963.
18. DYE, D.W. & LELLIOTT, R.A. Genus II. *Xanthomonas*
Dowson 1939, 187. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E.
Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed.
Baltimore Williams & Wilkins, 1974. p. 243-249.
19. ELLIOTT, C. Manual of bacterial plant pathogens.
Waltman, Chronic Botanica, 1951.
20. ELROD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of the
genus *Xanthomonas*. I. Cross-agglutination relation-
ships. *J. Bacteriol.*, 53: 509-518, 1947.

21. ELROD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. II. *Xanthomonas translucens* group. *J. Bacteriol.*, 53: 519-624, 1947.
22. ELROD, R.P. & BRAUN, A.C. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. III. The *Xanthomonas vascularum* and *Xanthomonas phaseoli* groups, the intermediate position of *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.*, 54: 349-357, 1947.
23. FALCÃO, D.P. et al. Unusual *Enterobacteriaceae* lactose-positive *Salmonella typhimurium* which is endemic in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 349-353, 1975.
24. FERNANDES, M.R. Resistência infecciosa a drogas em culturas de *Shigella*. Tese de Doutorado, USP, 1968.
25. HAYWARD, A.C. Methods of identification in the genus *Xanthomonas*. In: GIBBS, B.M. & SKINNER, F.A. Identification methods for microbiologists. London Academic, 1966. part A. p. 9-14.
26. HOLDING, J. The bacterial genera *Pseudomonas* and *Achromobacter*. In: BILLING, E. Review of symposium. *Nature (London)* 188: 25-27, 1960.

27. HORGAN, E.S. The value of serological testes for the identification of *Pseudomonas malvacearum*.
J. Bacteriol., 22: 287-293, 1931.
28. HUGH, R. & LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria.
J. Bacteriol., 66: 24-26, 1953.
29. HARTING, A.M. et al. Methods for studying bacteriocins.
In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. *Methods in Microbiology*. New York, Academic. 1972.
v.7A. p. 315-422.
30. JAWETZ, E. et al. Review of medical Microbiology.
California, Lange Medical, 1972. p. 518.
31. KIMURA, O. et al. A identificação de um novo grupo de *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson infectando a beringela (*Solanum melongena* L.) (Resumo).
In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, IX, Campinas, 1976.
32. KWAPINSKI, J.B. Methods of serological research.
New York, John Wiley, 1965. p.526.
33. KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature (London)*,
178: 703, 1956.

34. LAPAGE, S. et al. Proposed revision of the international code of nomenclature of bacteria.
Int. J. Syst. Bacteriol., 23:83-103, 1973.
35. LARPENT, J.P. & LARPENT-COURGAUD, M. Microbiologia Prática. São Paulo, Ed. Edgard Blucher, EDUSP, 1975.
36. LELLIOTT, R.A. The genus *Xanthomonas*.
In: GEESTERANUS, H.P.M. Proceedings of the third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Wageningen, Centre for Agricultural, 1972.
p. 269-272.
37. LINK, G.K.K. & SHARP, G.G. Correlation of host and serological specificity *Bacterium campestre*, *B. flacufaciens*, *B. phaseoli* and *B. phaseoli sojense*.
Bot. Gaz., 83: 145-160, 1927.
38. LOVREKOVICH, L. & KLEMENT, Z. Serological and bacteriophage sensitivity studies on *Xanthomonas vesicatoria* strains isolated from tomato and pepper.
Phytopathol. Z., 52: 222-228, 1965.
39. MORTON, D.J. et al. Serological differences between apparently typical pepper and tomato isolates of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathol.*,
57: 647-648, 1967.

40. NAMEKATA, T. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do "cancro crítico" e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., N.F.SP. *aurantifolia*, agente causal da "cancrose do limoeiro galego". Tese de Doutorado, USP, 1971.
41. PEREIRA, A.L.G. Contribuição ao estudo da etiologia da mancha oleosa da folha de maracuja (*Passiflora edulis* Sims.) causada por *Xanthomonas passiflora* n.sp. Tese de Doutorado, USP, 1968.
42. PERREAU, P. La serotypie de *Pasteurella multocida*. *Bull. Assoc. Vét. Microbiol. Spécial. Maladies Infect.*, 1: 25-37, 1967.
43. PERREAU, P. & CARTER, G.R. Studies on *Pasteurella multocida*. I-A hemagglutination test for identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, 16: 481-484, 1955.
44. ROBBS, C.F. et al. *Xanthomonas campestris* (Pammel) f. sp. *betae* f. sp. nov., incitante da "mancha bacteriana" das folhas da beterraba (*Beta vulgaris* L.) (Resumo). In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, IX, Campinas, 1976.
45. St. JOHN-BROOKS, R. et al. The investigation of phytopathogenic bacteria by serological and biochemical methods. *J. Pathol. Bacteriol.*, 28: 203-209, 1925.

46. STALL, R. E. & COOK, A.A. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* and lesion development in resistance and susceptible pepper. *Phytopathol.*, 56: 1152-1154, 1966.
47. STAPP, C. Handbuch der pflanzen-krankheiten.
In: _____. Bakterielle karankheiten. Berlin, Paul Parey, 1956. Band II 2.
48. STARR, M.P. Bacteria as plant pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.*, 13: 211-238, 1959.
49. STARR, M.P. & STEPHANS, W.L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *J. Bacteriol.*, 87: 293-302, 1964.
50. STOUT, J.D. A bacterial survey of some New Zealand Forest Lands, Grassland and Peats. *N.Z.J. Agric. Res.*, 4: 1-30, 1961.
51. TURNER, A.W. Bacterial oxidation of arsenite. I. Description of bacteria isolated from arsenical Cattle-dipping fluids. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7: 452-478, 1954.
52. VESTAL, A.L. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Washington, Dept^o Health, Education, 1969.
53. WILLIAMS, O.B. & GLASS, H.B. Agglutination studies on *Phytomonas malvaceara*. *Phytopathol.*, 21: 1181-1184, 1931.