

Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono

Growth of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* under different variable temperature, pH, sodium chloride concentrations and carbon sources

Márcia Tanajura Cavalcanti¹ Elineide Barbosa da Silveira²
Rosa de Lima Ramos Mariano³ Ivanise Oliveira Viana³

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da temperatura (0 a 45°C), pH (4 a 10) e concentração de NaCl (1 a 10%) sobre o crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac). Quatro estirpes de Aac foram cultivadas em meio de cultura líquido específico e o crescimento avaliado pela absorvância (580nm). Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão não linear. O crescimento das estirpes também foi avaliado em caldo base para fermentação contendo 1% dos carboidratos glicose, galactose, ramnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina, indicada pela mudança da cor do meio. Com base nas análises de regressão, as temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento de Aac foram, respectivamente, 1, 32 e 41°C; o pH ótimo para crescimento dessa bactéria foi 7,4 com os extremos mínimo de 4,0 e máximo de 10,8 e; o crescimento de Aac decresceu com o aumento da concentração de NaCl, sendo o nível de 6,2% letal. Todos os carboidratos testados foram utilizados pelas estirpes de Aac como fonte de carbono, com pequena variação de crescimento observada pela velocidade e intensidade da utilização do substrato com produção de ácido.

Palavras-chave: bactéria, mancha-aquosa, *Cucumis melo*, bioquímica, fisiologia.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of temperature (0 to 45°C), pH (4 to 10) and NaCl concentration (1 to 10%) in the growth of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac). Four Aac strains were grown in specific liquid medium, and their growth evaluated by absorbance

(580nm). Data were submitted to nonlinear regression analysis. The bacterial growth was also studied in fermentation broth containing 1% of fermentable carbohydrates, glucose, galactose, rhamnose, sucrose, lactose, maltose, starch, inulin, mannitol, dulcitol, sorbitol and salicin, being evaluated by medium color change. Based upon regression analyses, the minimum, optimum and maximum temperatures for Aac growth were respectively 1, 32 and 41°C; the optimum pH for Aac growth was 7.4 with minimum and maximum of 4 and 10.8, respectively; Aac growth was reduced with the elevation of NaCl concentration and, 6.2% was lethal. All tested carbohydrates were utilized by Aac strains as carbon source. However small growth variations were observed by the speed and intensity of substrate utilization with acid production.

Key words: bacterium, fruit blotch, *Cucumis melo*, biochemistry, physiology.

INTRODUÇÃO

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* (Aac) (Schaad et al.) Willems et al. é o agente causal da mancha-aquosa, importante fitobacteriose da cultura do melão (*Cucumis melo* L.). A doença ocorre nas áreas produtoras do Nordeste, principalmente no Rio Grande do Norte, onde se estimam perdas em torno de 40 a 50 % (SALES JÚNIOR & MENEZES, 2001). Essa bactéria apresenta-se na forma de bastonete Gram-negativo, aeróbico e móvel por um flagelo polar; na maioria dos meios de cultura as colônias são brancas ou de coloração creme e não são fluorescentes em

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

²Departamento Biologia/Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: elineidebs@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

³Departamento Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

meio de King B; não hidrolisa a arginina e apresenta reação positiva para os testes de catalase, oxidase, urease e lipase (SCHAAD et al., 1978).

Considerável atenção tem sido dada às investigações sobre variabilidade de *Aac* e epidemiologia da mancha-aquosa (SILVEIRA et al., 2003a,b; 2004). Entretanto, poucos estudos têm sido conduzidos sobre os fatores que afetam o crescimento dessa bactéria. Segundo BARBOSA & TORRES (1999) o metabolismo celular de uma bactéria está diretamente ligado a fatores físicos e químicos do ambiente, pois estes interferem na assimilação dos nutrientes a serem utilizados. Para atingir o máximo de desenvolvimento uma bactéria necessita principalmente de condições ideais de temperatura, pH, concentração de sais e nutrientes, entre outras. De acordo com a literatura, estirpes de *Aac* crescem à temperatura de 41°C, mas não a 4°C (SADDLER, 1994), enquanto dados sobre os requerimentos dessa bactéria no que se refere ao pH e concentração de sais são inexistentes. Com relação à utilização de carboidratos por *Aac* existem relatos contraditórios. Na descrição da estirpe tipo da subespécie, glicose e arabinose não são utilizados como fonte de carbono (SADDLER, 1994). Contudo, WILLEMS et al. (1992) verificaram que algumas estirpes cresceram nesses substratos e RANE & LATIN (1992) também verificaram que algumas estirpes de *Aac* utilizam trealose, diferindo da estirpe tipo.

Considerando a ausência de estudos sobre a fisiologia de *Aac* e algumas controvérsias quanto às características bioquímicas dessa bactéria, a proposta do trabalho foi determinar o efeito da temperatura, pH, concentração de NaCl e diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de *Aac*, visando à obtenção de informações básicas necessárias ao estudo aplicado da mancha-aquosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro estirpes de *Aac* obtidas de frutos de melão tipo Amarelo (*Aac1*, *Aac1.5* e *Aac1.43*) e Pele-de-sapo (*Aac5.1*) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O cultivo foi realizado em meio NYDA (extrato de carne – 3g; extrato de levedura – 5g; peptona – 5g; dextrose – 10g; ágar – 18g; água destilada – 1000mL) por 36 h e as suspensões em água destilada esterilizada foram ajustadas em fotocolorímetro para $A_{580} = 3,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹.

Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl.

O crescimento das estirpes de *Aac* foi avaliado em meio de cultura líquido NYD (extrato de carne – 3g; extrato de levedura – 5g; peptona – 5g; dextrose – 10g; água destilada – 1000mL) incubado em estufa tipo BOD (Biochemistry Oxygen Demand) às temperaturas de zero, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45°C; e em meio NYD com pH ajustado para 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0 com HCl e KOH a 1 M. O caldo nutritivo (extrato de carne – 3g; peptona – 5g; água destilada – 1000mL) suplementado com NaCl a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% foi utilizado no estudo do efeito da concentração deste sal. Alíquotas de 0,1mL das suspensões de células bacterianas foram depositadas em tubos de ensaio contendo 4,9mL dos diferentes meios. No estudo do efeito dos níveis de pH e concentração de NaCl, os tubos foram mantidos em BOD à 35°C. O delineamento experimental para cada variável analisada foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio. O crescimento foi avaliado após o período de incubação de 24h, utilizando-se fotocolorímetro (580nm) para leitura da concentração em absorbância, plotando-se as respectivas curvas.

As médias dos dados obtidos pelas quatro estirpes em relação ao crescimento nas diferentes temperaturas, pH e concentração de NaCl foram submetidas à análise de regressão não linear para selecionar modelos ajustados às curvas de crescimento de *Aac*, com base no coeficiente de determinação (R^2) e no quadrado médio do resíduo (QMR), utilizando-se o programa TableCurve™ 2D for Windows, Version 4.07 (SPSS Software Inc., Chicago - IL, USA, 1998).

Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em diferentes fontes de carbono.

Foi utilizado o caldo base para fermentação BTB (extrato de carne – 1g; protease peptona – 10g; cloreto de sódio – 5g; azul de bromotimol (sol. alcoólica 1,6%) – 1mL; água destilada – 1000mL) contendo 1% dos carboidratos fermentáveis glicose, galactose, rarnnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina. Os carboidratos foram esterilizados por filtração em membrana de nitrocelulose (diâmetro do poro de 0,22µm; Millipore UK Ltd) e então adicionados ao meio de cultura já esterilizado. O método e o delineamento experimental foram os mesmos descritos anteriormente. O crescimento positivo nos diferentes carboidratos foi determinado após 2, 4 e 7 dias de incubação (MARIANO et al., 2000) sendo a utilização do substrato como fonte de carbono com produção de ácido indicada pela troca da cor do meio de verde para amarela.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento das quatro estirpes de *Aac* em diferentes temperaturas está apresentado na figura 1, existindo uma correspondência entre o aumento da temperatura e o aumento do crescimento de todas as estirpes, até 35°C, com pequenas variações. Baseado na média do crescimento das quatro estirpes nas diferentes temperaturas foi estabelecida a equação da curva de crescimento através do modelo não linear $Y = (-0,00072 + 0,00126x - 0,00003x^2) / (1 - 0,05486x + 0,00079x^2)$ sendo y a variável dependente (absorbância) e x a variável independente (temperatura). Esse modelo apresentou um bom ajuste com coeficiente de determinação (R^2) de 90,27%. De acordo com essa equação, *Aac* apresenta como temperaturas mínima, ótima e máxima de crescimento 1, 32 e 41°C, respectivamente. Esses resultados estão parcialmente de acordo com SADDLER (1994), que relatou *Aac* crescendo a 41°C, mas não a 4°C. O fato da bactéria no presente estudo poder crescer até a 1°C pode ser explicado por diferenças entre os meios de cultura utilizados nas duas pesquisas, uma vez que no trabalho de SADDLER não são citados os meios utilizados para

os testes de crescimento a diferentes temperaturas. A temperatura é um dos fatores mais importantes do ambiente, pois influencia a absorção de nutrientes, o crescimento e a sobrevivência dos organismos, determinando de modo geral a velocidade das reações metabólicas, por atuar na atividade enzimática (BARBOSA & TORRES, 1998). A limitação do crescimento pela temperatura mais baixa depende da solidificação dos lipídios e da membrana, ou ainda, da sensibilidade ao resfriamento do processo de iniciação da síntese de proteínas. Por outro lado, um pouco acima da temperatura limite, muitas enzimas são desnaturadas e a célula morre (TORTORA et al., 2002).

A temperatura exerce efeito nos processos de colonização e reprodução das bactérias e, conseqüentemente, no desenvolvimento da doença (BEDENDO, 1995). No caso de *Aac*, SILVEIRA et al. (2004) verificaram que a temperatura influenciou significativamente a severidade da mancha-aquosa em frutos de melão, com a doença desenvolvendo-se na faixa de temperatura entre 20 e 40°C, sendo as maiores lesões na casca observadas nos frutos incubados a 35 e 30°C, sem câmara úmida e a 30°C com câmara úmida de 6h. As temperaturas mais favoráveis ao

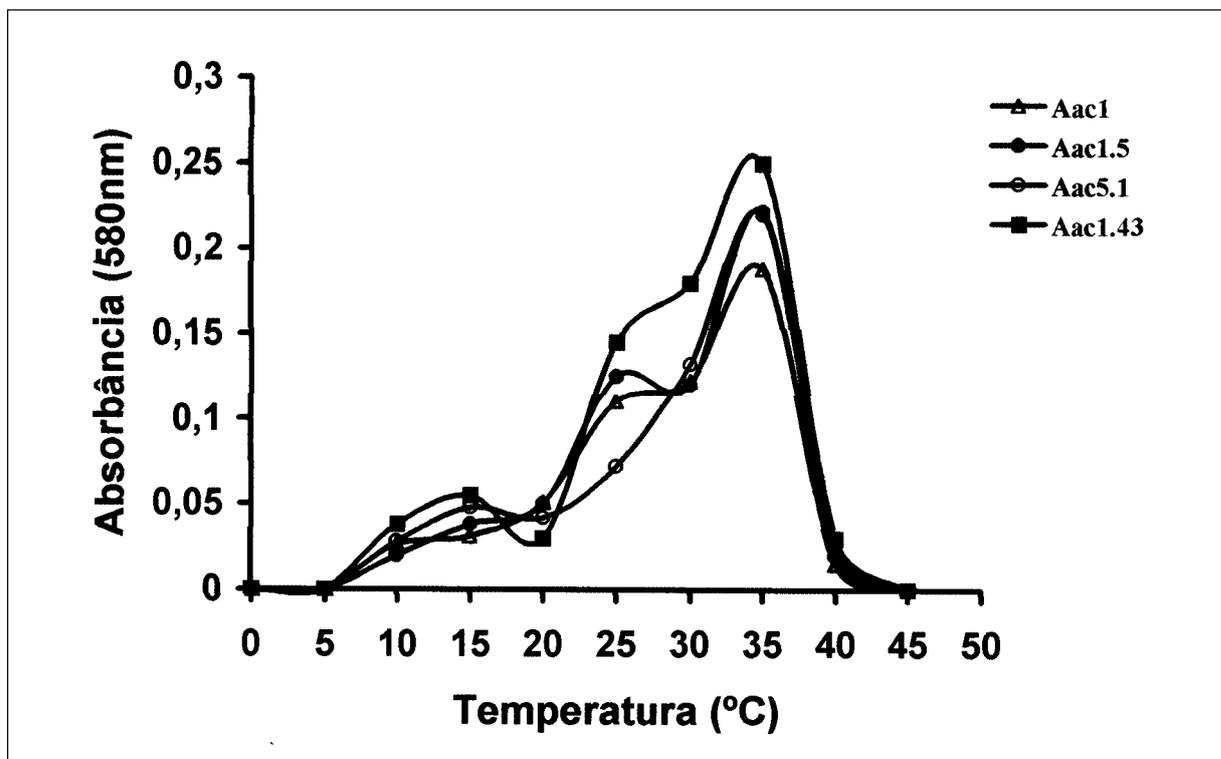


Figura 1 - Crescimento de estirpes de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em diferentes temperaturas de incubação.

desenvolvimento da mancha-aquosa no campo estão dentro da faixa de temperatura ótima para o crescimento de *Aac* em meio de cultura.

Verificou-se que todas as estirpes de *Aac* cresceram numa ampla faixa de pH (4 a 10), com pequenas variações nos pHs 7, 7,5 e 8 (Figura 2). O modelo não linear $Y = -0,515 + 0,178x - 0,012x^2$, onde $y =$ absorvância e $x =$ pH), apresentou um bom ajuste com R^2 de 88,2%. O pH ótimo para crescimento de *Aac*, baseado nesse modelo, é 7,4. Agentes bacterianos causam maiores danos quando o pH atinge valores próximos à neutralidade ou ligeira alcalinidade (BEDENDO, 1995). Essa bactéria é neutrófila, requerendo valores de pH próximo a neutralidade para sua nutrição e crescimento (SADDLER, 1994). Várias outras bactérias, como *Burkholderia cepacia* e *Ralstonia solanacearum*, também requerem pH próximo a neutralidade para maior crescimento (SADDLER, 1994). Os extremos mínimo e máximo de pH para *Aac* são respectivamente 4 e 10,8. O pH pode promover alteração na sobrevivência, penetração e reprodução de fitopatógenos veiculados pelo solo, determinando a ocorrência e a severidade de doenças (BEDENDO, 1995).

As quatro estirpes de *Aac* cresceram similarmente nos meios contendo 1, 2, 3, 4 e 5% de NaCl (Figura 3). Nas concentrações de NaCl de 6 a 7% observou-se ausência de crescimento bacteriano. Baseado no modelo não linear $Y = 0,1179 - 0,0228x +$

$0,0001x^3$ ($y =$ absorvância e $x =$ NaCl) que apresentou um bom ajuste com R^2 de 91,25%, verificou-se que a população da bactéria diminuiu com o aumento da concentração de NaCl, sendo o nível de 6,2% letal a essa fitobactéria, uma vez que o ambiente torna-se hipertônico. Nessas condições a célula perde água através da membrana plasmática, para o meio extracelular, com conseqüente inibição do crescimento (TORTORA et al., 2002).

As quatro estirpes de *Aac* utilizaram como fonte de carbono todos os carboidratos testados, apresentando pequena variação de crescimento observada pela velocidade e intensidade da utilização do substrato com produção de ácido (Tabela 1). A estirpe *Aac1.43* apresentou uma utilização mais rápida de todos os carboidratos, sendo observado no quarto dia reação positiva para quase todos, com exceção da ramnose com reação positiva fraca. No segundo dia reações negativas foram observadas para a maioria dos carboidratos nas estirpes *Aac1*, *Aac1.5* e *Aac5.1*, assim como reações positivas fracas se destacaram no quarto dia. Na descrição da estirpe tipo da subespécie, maltose, inulina, dulcitol e salicina, não eram utilizados como fonte de carbono (SADDLER, 1994), bem como ramnose, sacarose e lactose, pela estirpe tipo e outras estirpes da subespécie (RANE & LATIN, 1992; SADDLER, 1994). Segundo RANE & LATIN (1992) inulina e manitol também não foram utilizados por essa bactéria como fonte de carbono.

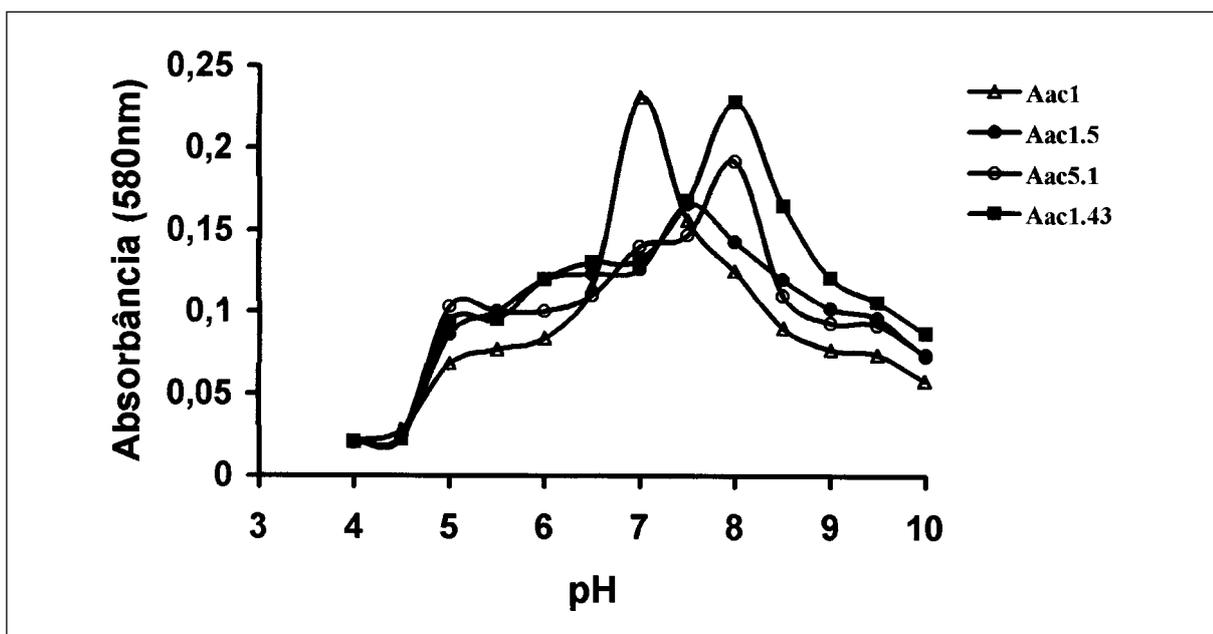
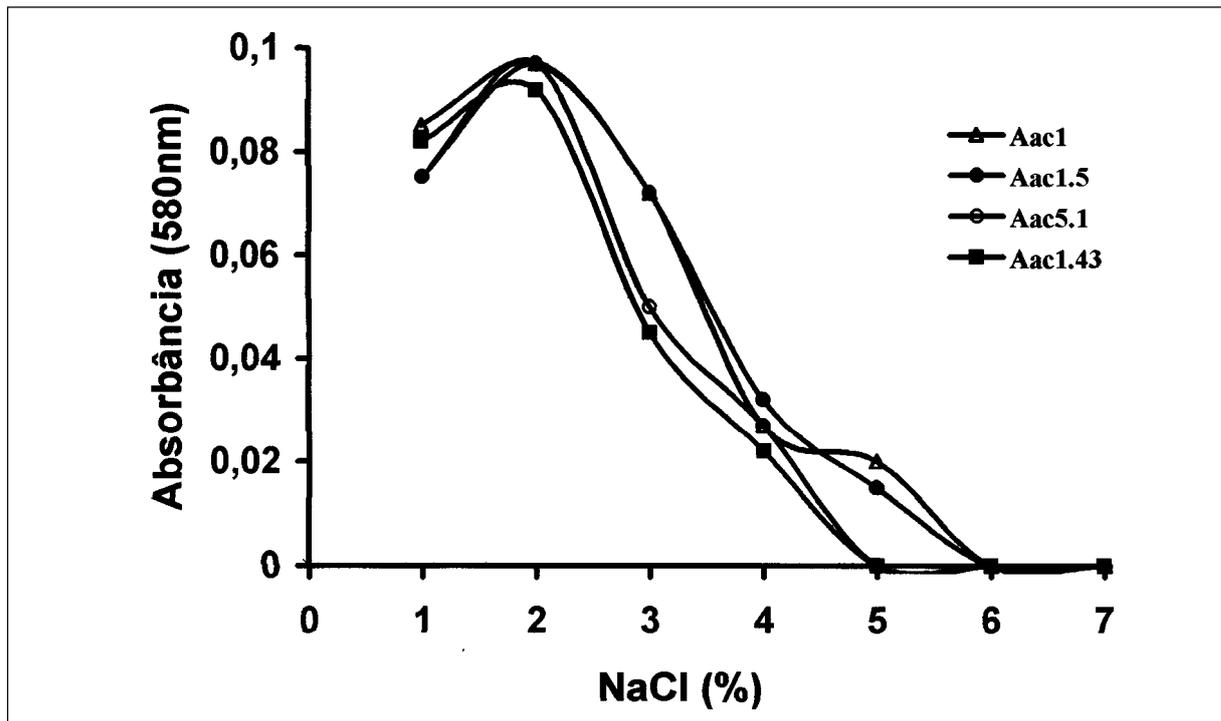


Figura 2 - Crescimento de estirpes de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em diferentes níveis de pH.

Figura 3 - Crescimento de estirpes de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em diferentes concentrações de NaCl.Tabela 1 - Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes fontes de carbono.

Carboidrato	Estirpe de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>											
	<i>Aac1</i>			<i>Aac1.5</i>			<i>Aac5.1</i>			<i>Aac1.43</i>		
	2 ¹	4	7	2	4	7	2	4	7	2	4	7
Glicose	- ²	+	+	-	+	+	(±)	+	+	+	+	+
Ramnose	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+
Galactose	(±)	+	+	-	(±)	+	(±)	+	+	+	+	+
Sacarose	-	+	+	-	+	+	(±)	+	+	+	+	+
Lactose	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	(±)	+	+
Maltose	(±)	(±)	+	(±)	(±)	+	(±)	+	+	+	+	+
Amido	(±)	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	+	+
Inulina	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	+	+
Manitol	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	+	+
Sorbitol	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	+	+
Dulcitol	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	+	+
Salicina	-	(±)	+	-	(±)	+	-	(±)	+	-	+	+

¹ Dias após inoculação;² Reações: positiva (+); positiva fraca (±); negativa (-).

Essas diferenças indicam a variabilidade existente entre as diversas estirpes patogênicas de *Aac*, estando esta variação relacionada às características genéticas de cada estirpe e também à capacidade de adaptação ao hospedeiro e ao ambiente.

CONCLUSÕES

Temperatura de 32°C e pH 7,4 são condições ótimas para crescimento de *Aac*. O crescimento dessa bactéria é inversamente proporcional à concentração

de NaCl no meio de cultura, sendo nulo a 6%. Os carboidratos glicose, galactose, ramnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina são utilizados por *Aac* como fonte de carbono. A temperatura, pH, concentração de NaCl e fonte de carbono influenciam o crescimento de *Aac* in vitro indicando a importância dessas variáveis no ciclo da mancha-aquosa do melão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq (Proc. No. 473024/2003-9) e UFRPE.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Nutrição e metabolismo bacterianos. In: TRABULSI, L.R. et al. (Eds). **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.25-54.
- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. Nutrição. In: BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. (Eds). **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.89-101.
- BEDENDO, I.P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.331-341.
- MARIANO, R.L.R. et al. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: O autor, 2000. p.67-108.
- RANE, K.K.; LATIN, R.X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, p.509-512, 1992.
- SADDLER, G.S. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.128, p.47-48, 1994.
- SALES JÚNIOR, R.; MENEZES, J.B. **Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 2001. 29p. (Relatório técnico).
- SCHAAD, N.W. et al. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.28, p.117-125, 1978.
- SILVEIRA, E.B. et al. Variabilidade de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio Grande do Norte. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.3, p.255-261, 2003a.
- SILVEIRA, E.B. et al. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.171-175, 2003b.
- SILVEIRA, E.B. et al. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.1, p.034-038, 2004.
- TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. 827p.
- WILLEMS, A. et al. Transfer of several phytopathogenic pseudomonas species to acidovorax as acidovorax-avenae subsp. avenae subsp-nov, comb-nov, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.107-119, 1992.