



## **Caracterização de Linhagens Patogênicas de Bactérias da Família *Xanthomonadaceae***

**Palavras chave: interações microbianas, sistemas de secreção, bactérias**

**Nome: Laura Gonsalves Cruvinel, Unicamp**

**Orientadora: Profa Dra Cristina Elisa Alvarez Martinez, Unicamp**

**Co-autor: José Felipe Teixeira da Silva Santos**

**Apoio Financeiro: Fapesp 22/06555-3**

### **Introdução**

#### **1. Introdução**

A família *Xanthomonadaceae* se caracteriza por diversos grupos de bactérias Gram-negativas encontradas em associação a plantas e/ou ao solo, incluindo fitopatógenos de grande relevância e espécies promotoras de crescimento vegetal, destacando-se os gêneros *Xanthomonas*, *Xylella*, *Lysobacter* e *Stenotrophomonas*. Os gêneros *Xanthomonas* e *Xylella* incluem importantes fitopatógenos de diversas variedades agrícolas, incluindo plantas cítricas, banana, arroz, uva, repolho, entre outros (Timilsina, 2020). O gênero *Xanthomonas* contém aproximadamente 30 espécies patogênicas para uma grande diversidade de plantas de importância na atividade agrícola e estudos recentes levaram à identificação de um limitado número de espécies consideradas não patogênicas (Timilsina et al., 2020). *Xanthomonas* sp. são encontradas no solo e na superfície de folhas como epífitas, sem causar doença na planta.

A espécie *X. citri* vem sendo estudada pelo nosso grupo de pesquisa. Esta espécie é encontrada de forma endêmica em países produtores de citros, sendo mais prejudicial para plantas jovens. Apesar de sua evidente importância comercial, o gênero *Xanthomonas* ainda é um grupo cuja resistência no ambiente é pouco entendida, o que torna necessário estudos mais detalhados para sua caracterização.

Sistemas de secreção são maquinarias macromoleculares que atravessam o envelope bacteriano e promovem a secreção de proteínas para o ambiente externo ou diretamente para o interior de uma célula-alvo eucariótica ou procariótica, sendo um mecanismo fundamental para diversas interações com o ambiente externo, incluindo a colonização de hospedeiros e a competição com outros microrganismos. Em bactérias gram-negativas os sistemas de secreção foram divididos em 6 grupos principais, denominados, sistema de secreção do tipo I (SST1) ao 6 (SST6) (Almeida, 2016). O sistema de secreção tipo VI (SST6), descrito mais recentemente, é uma maquinaria contrátil composta por treze proteínas estruturais centrais. Estas proteínas são codificadas em clusters gênicos e formam três grandes complexos: complexo transmembrana, baseplate e cauda (Bayer-Santos et al., 2019). Desta forma, o SST6 é capaz de transpassar uma terceira membrana transferindo diretamente as proteínas efetoras para a célula alvo.

Um estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que a espécie *X. citri* apresenta resistência a predação pela ameba de solo *Dictyostelium discoideum*, um predador natural de bactérias no ambiente que utiliza mecanismo de fagocitose similar ao utilizado por células fagocíticas do sistema imune (Bayer-Santos et al., 2018). Além disto, foi demonstrado que a resistência a *D.*

*discoideum* depende de um SST6 de *X. citri*, sendo eliminada em linhagens contendo mutações em componentes essenciais para o funcionamento da maquinaria de secreção (Bayer-Santos et al., 2018). Uma análise da distribuição de clusters gênicos que codificam SST6 em genomas de bactérias da família *Xanthomonadaceae* disponíveis no banco de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) demonstrou um perfil bem diverso, com diversas espécies contendo representantes desta família (Bayer-Santos et al., 2019).

Uma vez que a predação de bactérias por amebas modula de forma significativa a distribuição de bactérias nos mais diversos ambientes, é importante caracterizar o perfil de resistência a *D. discoideum* entre diferentes grupos da família *Xanthomonadaceae*. O objetivo do presente estudo é caracterizar diferentes espécies do gênero *Xanthomonas* quanto ao perfil de resistência a fagocitose por *D. discoideum*, correlacionando os resultados obtidos com a análise dos genomas destas espécies, avaliando a presença dos genes do SST6.

## **Metodologia**

Além dos ensaios de Resistência à Predação por *D. discoideum* também foram realizados ensaios de curva de crescimento das linhagens, uma vez que as diferentes taxas de crescimento podem influenciar o resultado observado no ensaio de predação.

### **Ensaio de Curva de Crescimento**

Para cada ensaio, foram preparadas previamente inóculos das culturas em meio LB (10 g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de NaCl) e incubadas a 28° C sob agitação por 16 h.

Para o ensaio foi preparada, a partir do pré-inóculo, uma cultura inicial de concentração 0,1 em DO<sub>600nm</sub> em 15 mL do meio desejado. Esta cultura foi posta em um erlenmeyer e alocada em um shaker a 200 rpm a 28°C.

O crescimento foi monitorado a cada duas horas pela determinação da DO<sub>600nm</sub>. Os pontos correspondentes a duas, quatro, seis, oito e vinte quatro horas a partir do tempo zero foram coletados

Após a coleta de dados de triplicata biológica de cada linhagem (experimentos independentes) foi feito o cálculo de média e erro padrão, em seguida reunidas as informações das linhagens testadas em um mesmo meio por meio de um gráfico.

Além do meio de cultura LB, foram realizados testes nos meios NYG (5g/L de peptona, 3g/L de extrato de levedura, 20ml/L de glicerol) e YSG (5g/L de extrato de levedura, 5g/L de glicose, 0,5g/L de fosfato de amônio monobásico, e 0,2g/L de fosfato de potássio dibásico anidro).

### **Ensaio de Resistência à Predação por *D. discoideum***

O ensaio de placa de fagocitose nos permite comparar a sensibilidade quanto a predação da ameba *D. discoideum* de diferentes linhagens de cepas bacterianas e o tipo selvagem. Neste ensaio, seguindo o protocolo adaptado de Froquet, 2009, quantidades decrescentes de células de ameba são aplicadas sobre tapete bacteriano em placas de 24 poços. A sensibilidade da bactéria é observada pela formação de um halo central de inibição de crescimento devido a atividade fagocítica das amebas.

## **Resultados**

### **Resultados Ensaio de Curva de Crescimento**

Foi observado que as culturas das linhagens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitícola* e *Xanthomonas citri* pv *citri* 306 flocculam no meio NYG a partir de 4 horas de incubação, indicando auto agregação,

possivelmente pela produção de adesinas. Também foi constatado que as linhagens *X. albilineans* e *X. campestris* pv. *campestris* não crescem em meio LB.

### **Resultados Ensaios de Resistência à Predação por *D. discoideum***

Nestes ensaios o padrão de resistência é indicado pelo halo formado no centro de cada poço pela atividade fagocítica de *D. discoideum*, de forma que quanto mais sensível maior o halo formado. Os resultados obtidos até o momento demonstraram que as espécies *X. fragariae*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *vitians* e *X. cassavae* são predadas por *D. discoideum*, sendo mais sensíveis em comparação a espécie *X. citri* pv. *citri*, que possui o SST6. Em contraste, as espécies *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *X. axonopodis* pv. *viticola* apresentaram um padrão de formação de halos fagocíticos pela ameba similares ao da cepa selvagem, mostrando resistência à predação, o que indica a presença de um mecanismo de defesa nestas espécies.

### **Bibliografia**

ALMEIDA, Raquel das Neves. Caracterização do papel do sistema de secreção do tipo VI bacteriano sobre a resposta imunológica inata de células de mamíferos infectados por *Escherichia coli*. 2016.

BAYER-SANTOS, Ethel et al. Distribution, function and regulation of type 6 secretion systems of Xanthomonadales. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1635, 2019.

BAYER-SANTOS, Ethel et al. *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to *Dictyostelium* predation and is regulated by an ECF  $\sigma$  factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environmental Microbiology*, v. 20, n. 4, p. 1562-1575, 2018.

FROQUET, Romain et al. *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nature protocols*, v. 4, n. 1, p. 25-30, 2009

Tilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A. et al. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol* 18, 415–427 (2020).