

ELIMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS EM *Erwinia* E *Pseudomonas* FITOPATOGÊNICAS.

C.M.R. de BIAGI,¹; J.L. AZEVEDO²

¹Faculdade de Ciências Biomédicas, CEP: 13600-000 - Araras, SP

²Departamento de Genética-ESALQ/USP, C.P. 83 - CEP: 13418-900 - Piracicaba, SP

RESUMO: Duas linhagens de bactérias fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas* e duas do gênero *Erwinia* produtoras de bacteriocinas, foram submetidas a diferentes tratamentos visando estimar a estabilidade desse caráter. Houve eliminação da produção de bacteriocinas após tratamento com duas concentrações de brometo de etídio e a porcentagem de eliminação variou com o hospedeiro e com a concentração da droga. Não houve eliminação em temperaturas elevadas e também a preservação da linhagem por três anos em laboratório não causou perda do caráter. A eliminação da produção de bacteriocinas com brometo de etídio sugere que os genes envolvidos tenham localização plasmidiana.

Descritores: bacteriocina, *Erwinia*, *Pseudomonas*

ELIMINATION OF BACTERIOCIN PRODUCTION IN THE PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *Erwinia* AND *Pseudomonas*

ABSTRACT: Four strains, two from each of the plant pathogenic bacteria *Pseudomonas* and *Erwinia*, all producing bacteriocins, were submitted to different treatments in order to evaluate the persistence of bacteriocin production. After ethidium bromide treatment elimination of the bacteriocin production was achieved and the percentage of loss varied with the host strain and drug concentration. Elimination was not detected after treatment with high temperatures, above the normal ones. Also preservation of the strains for three years, in laboratory, did not cause elimination of the character. The curing of bacteriocin production after ethidium bromide treatment suggests that the involved genes are located in plasmids.

Key Words: bacteriocine, *Erwinia*, *Pseudomonas*

INTRODUÇÃO

Bacteriocinas são substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias que possuem genes designados de *Bac*, em geral localizados em elementos extracromossômicos, os plasmídios bacteriocinogênicos. BIAGI & AZEVEDO (1992) verificaram que a produção de bacteriocinas pode ser facilmente detectada em bactérias fitopatogênicas e otimizaram as condições para sua detecção. Uma vez que plasmídios são hoje largamente usados como vetores na tecnologia do DNA recombinante (AZEVEDO, 1985; COSTA, 1987; PRIMROSE, 1987) e uma vez que bactérias produtoras de bacteriocinas tem sido também preconizadas como auxiliares no controle de doenças de plantas, não só a detecção como a estabilidade da característica produção de bacteriocinas, são de importância. O presente

trabalho teve por objetivo verificar a estabilidade da produção de bacteriocinas tanto espontaneamente como na presença de agentes conhecidos como curagênicos ou eliminadores de plasmídios bacterianos como é o caso do brometo de etídio, temperaturas elevadas e estocagem em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens e meio de cultura: Foram utilizadas as linhagens E-11 e E-30 de *Erwinia* e P-49 e P-58 de *Pseudomonas*. O origem e métodos de conservação das mesmas encontram-se descritas em BIAGI & AZEVEDO (1992). O meio de cultura utilizado foi o 523 de KADO & HESKETT (1970) tanto líquido como sólido, este último com adição, ao meio mínimo de 15g de ágar para completar o volume de 1 litro.

Eliminação da produção de bacteriocinas: Foram utilizados o brometo de etídio (BE) e altas temperaturas como agentes capazes de eliminação de bacteriocinas. O BE foi adicionado a tubos contendo meio 523 líquido nas concentrações de 100 e 500 ug/ml aos quais foram inoculados 0,1 ml de cada uma das linhagens utilizadas em cada tubo empregado, provenientes do mesmo meio após crescimento por 24 horas a 28°C. As concentrações de BE utilizadas, foram empregadas com base em ensaios preliminares que evidenciaram serem estas concentrações as que inibiam parcialmente o crescimento de bactérias sem entretanto causar morte total da cultura. Após 24 horas de crescimento, alíquotas foram retiradas dos tubos e semeadas em meio 523 sólido, em diluições apropriadas para produção de colônias isoladas. Um mínimo de 400 colônias para cada tratamento e controle foi utilizado para detecção e consequentemente eliminação da produção de

bacteriocinas segundo a metodologia descrita por AZEVEDO & COSTA (1973) utilizando-se as modificações sugeridas por BIAGI & AZEVEDO (1992). Para eliminação de bacteriocinas em altas temperaturas utilizaram-se incubações a 28°C (controle) 37°C e 45°C (tratamentos). Tubos contendo meio 523 líquido foram inoculados com 0,1 ml de cada linhagem por tubo, provenientes de cultura desenvolvida em meio 523 líquido por 24 horas a 28°C. Após inoculação, os tubos foram incubados a 28°C, 37°C e 45°C por 24 horas. Após a mesma metodologia e número de colônias utilizadas para o BE, foi também empregada. Para verificar a influência da estocagem na eliminação da característica produção de bacteriocinas, foram utilizadas culturas mantidas em estoque por um período de 3 anos em meio sólido inclinado com repiques eventuais, empregando-se a seguir, a mesma metodologia usada para o BE e temperaturas elevadas.

TABELA 1 - Porcentagens de eliminação da produção de bacteriocinas em linhagens de *Erwinia* e *Pseudomonas* submetidas a agentes curagênicos.

Linhagens	Agentes Curagênicos(*)	N Colônias analisadas	% Eliminação
E-11	28°C	416	0,00
	BE (100)	439	12,30
	BE (500)	400	37,75
	37 e 45°C	500	0,00
	Estocagem 3 anos	450	0,00
E-30	28°C	435	0,00
	BE (100)	451	0,22
	BE (500)	448	1,12
	37 e 45°C	504	0,00
	Estocagem 3 anos	400	0,00
P-49	28°C	400	0,00
	BE (100)	400	1,00
	BE (500)	402	4,23
	37 e 45°C	502	0,00
	Estocagem 3 anos	501	0,00
P-58	28°C	457	0,00
	BE (100)	466	2,15
	BE (500)	415	43,40
	37 e 45°C	500	0,00
	Estocagem 3 anos	410	0,00

(*) 28°C: controle tanto para BE (brometo de etídio) como para temperaturas mais elevadas; BE (100) e BE (500) são concentração de 100 e 50 ug/ml de BE respectivamente; 37-45°C foram as temperaturas de incubação utilizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TABELA 1 apresenta os dados relativos a eliminação de produção de bacteriocina com BE, temperatura elevada e estocagem por um período de 3 anos. Como pode ser verificado, apenas o brometo de etídio causou a eliminação do caráter nas linhagens ensaiadas sendo que a porcentagem de eliminação foi maior na concentração mais elevada de BE e também dependeu das linhagens utilizadas. Todas as linhagens em condições normais, isto é, na ausência do brometo de etídio e crescendo na temperatura de 28°C foram bastante estáveis, não sendo verificada perda característica de produção de bacteriocina. Também quando bactérias das quatro linhagens foram mantidas a 37°C e 45°C por 24 horas e depois ensaiadas, verificou-se que elas mantiveram a característica em estudo mostrando que as temperaturas acima daquelas que permitem crescimento ótimo das linhagens não são curagênicas.

Também a preservação das linhagens por 3 anos em meio inclinado não afetou a produção de bacteriocinas. O BE é conhecido como eliminador de plasmídios em *Staphylococcus aureus* (WARREN et al, 1974) e outras bactérias. Também na mesma espécie LACHOWICZ (1975) verificou eliminação da produção de bacteriocinas. Embora nas temperaturas utilizadas não tenha sido possível verificar a eliminação do caráter, talvez em temperaturas pouco acima de 28°C isso possa ocorrer. A persistência do caráter produção de bacteriocinas mesmo após estocagem das culturas com repiques eventuais durante 3 anos mostrou que o caráter é bastante estável como aliás já verificado por outros autores como VIDAVER et al (1972) em *Pseudomonas fitopatogênicas*. Igualmente, ECHANDI (1976) não verificou eliminação do caráter mesmo após estocagem prolongada de linhagem bacteriocinogênica de *Corynebacterium michiganense*. A eliminação do caráter estudado em presença de BE é forte indicação de que os genes para produção de bacteriocina estejam em elemento extracromossômico ou plasmídio.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são devidos ao CNPq (bolsa doutorado) e à CAPES (bolsa dedicação acadêmica) concedidas ao 1º e 2º autores respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, J.L. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*, Piracicaba: FEALQ, 1985. 173p.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*, São Paulo: EDUSP, 1973. 288p.
- BIAGI C.M.R.; AZEVEDO, J.L. Detecção de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.49, p.1-8, 1992.
- COSTA, S.O.P. *Genética molecular e de microrganismos*. São Paulo: Manole, 1987, 559p.
- ECHANDI, E. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology*, Lancaster, v.66, p.430-432, 1976.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, Lancaster, v.60, p.969-976, 1970.
- LACHOWICZ, T. Investigation on *Staphylococcins*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten and Hygiene* (Abt. I), Stuttgart, n.196, p.340-351, 1975.
- PRIMROSE, S.B. *Modern biotechnology*, Oxford: Blackwell, 1987. 176p.
- VIDAVER, A.K.; MATHYS, M.L.; THOMAS, M.E.; SCHUSTER, M.L. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.18, p.705-713, 1972.
- WARREN, R.; ROGOLSKI, M.; WILEY, B.B.; GLASGOW, L.L. Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.118, p.980-985, 1974.

Entregue para publicação em 09.08.94
Aceito para publicação em 29.12.94